

**IDENTIFIZIERUNG NIEDERMOLEKULARER, POLARER
ZUCKERUMWANDLUNGSPRODUKTE SOWIE
NACHWEIS EINES PROTEINGEBUNDENEN PRODUKTS AUS DER
SPÄTPHASE DER MAILLARD-REAKTION**

Manfred Sengl

Disbui. München
1988



Identifizierung niedermolekularer, polarer
Zuckerumwandlungsprodukte sowie
Nachweis eines proteingebundenen Produkts aus der
Spätphase der Maillard-Reaktion

D I S S E R T A T I O N

der
Fakultät Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Manfred Sengl
aus Puchheim b. München

München 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eiden

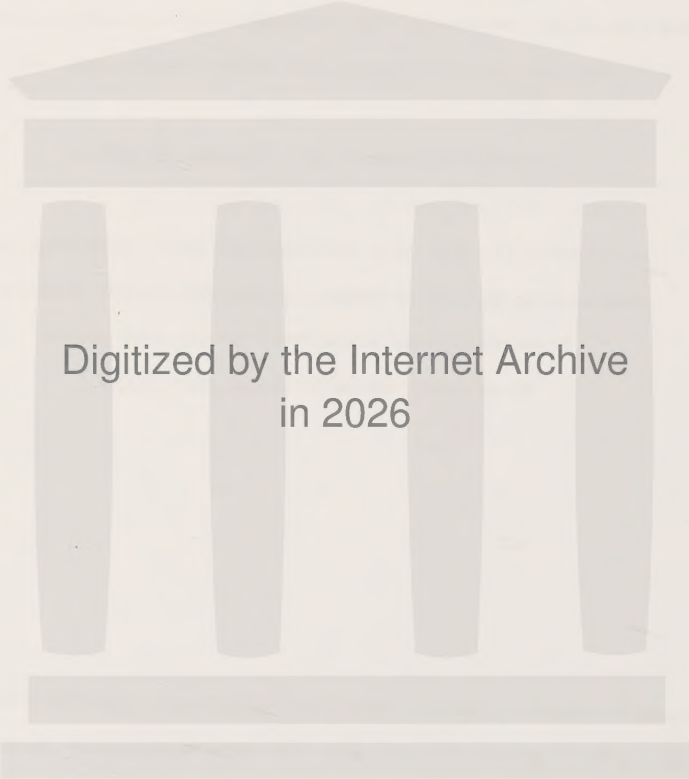
Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1988

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie
und Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität
München auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Theodor Severin

angefertigt. Für die großzügige Unterstützung und
Förderung dieser Arbeit, sowie für seine stetige
Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn
Professor Severin ganz herzlich.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle auch bei
Herrn Dr. habil. Franz Ledl für die engagierte Betreuung
dieser Arbeit bedanken. Durch seine stets wertvollen
Ratschläge und Anregungen hat er die Durchführung dieser
Arbeit wesentlich unterstützt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Ich danke

- Frau K. Fritsch für die Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren
- Frau E. Visintainer für die Aufnahme der Massenspektren
- Herrn Dr. H. Lerche für die stets wohlwollende Hilfe bei der Spektren-Interpretation
- Herrn Professor Dr. Schäfer und Frau I. Burow vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried für GC-MS- sowie FAB-MS-Messungen
- Herrn Dr. Wieser von der Deutschen Forschungsanstalt in Garching für die Durchführung der Aminosäure-Analysen
- Frau M. Mießl und Frau S. Kaus für ihre autopterungsvolle Hilfe bei der Synthese von Ausgangsverbindungen

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil	Seite
A. Einleitung	1
B. Polare, niedermolekulare Zuckerumwandlungsprodukte	3
1. Einführung	3
2. Zuckerabbau in der frühen Phase der Maillard-Reaktion	4
3. Polare Zuckerumwandlungsprodukte	6
3.1. Zucker/Amin-Modell-Gemische und Methodik	6
3.2. Säuren und Lactone	8
3.2.1. Säuren	8
3.2.2. Lactone	25
3.3. Ester	28
3.4. Säureamide	39
4. Quantitative Betrachtungen	44
C. Proteingebundene Zuckerumwandlungsprodukte	47
1. Auftreten proteingebundener Zuckerumwandlungsprodukte	47
1.1. Nachweis der katalytischen Wirkung des Proteins	47
1.2. Bekannte proteingebundene Umwandlungsprodukte	48
1.3. N-haltige Hauptprodukte der Maillard-Reaktion	52

1.4. Synthese von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-1-norleucin <u>110</u>	53
2. Nachweis der Bildung von <u>110</u> beim Erhitzen von Rinderserumalbumin (RSA) mit Glucose	57
2.1. Proteinumsetzungen, Hydrolyse und Vorfraktionierung	57
2.2. Nachweisverfahren für 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-1-norleucin <u>110</u>	59
2.2.1. Aminosäure-Analyse	59
2.2.2. HPLC/UV	60
2.2.3. HPLC/Floureszenzdetektion	61
2.2.4. Colorimetrie	63
2.2.5. MS/MS	64
2.2.6. Gaschromatographie	65
2.2.7. Katalytische Reduktion des proteingebundenen Pyrrols <u>110</u> zur Herstellung eines säurestabilen Derivats	66
2.3. Ergebnisse und Diskussion	67
D. Zusammenfassung	70
Experimenteller Teil	
1. Allgemeine Angaben	73
II. Spezielle Arbeitsmethoden	76

1. Silylierung (allgemeine Arbeitsvorschrift)	76
2. Zucker/Glycin-Umsetzungsgemische	77
3. Synthesen und analytische Daten der Vergleichssubstanzen	77
3.1. Lactone	77
3.1.1. 2-Desoxyribonolacton (<u>7</u>)	77
3.1.2. Erythronolacton (<u>50</u>)	78
3.1.3. Metasaccharinsäurelacton (<u>60</u>)	79
3.1.4. 2-Desoxyerythronolacton (<u>62</u>)	79
3.2. Säuren	80
3.2.1. Milchsäure (<u>18</u>), Glykolsäure (<u>33</u>) und Glycerinsäure (<u>34</u>)	80
3.2.2. Erythronsäure (<u>22</u>), 2-Desoxyerythronsäure (<u>37</u>), 2-Desoxyribonsäure (<u>35</u>) und Ribonsäure (<u>36</u>)	81
3.2.3. β -Hydroxypropionsäure (<u>32</u>)	81
3.3. Ester	82
3.3.1. Synthese von 3-O-(2-Hydroxypropionyl)-3- hydroxypropionsäure (<u>64</u>) im Gemisch	82
3.3.2. Herstellung von <u>64</u> aus 4-O- β -D-Galacto- pyranosyl-2-hydroxy-2-methyl-2H-pyran- 3(6H)-on (<u>78b</u>)	82
3.3.3. Synthese von 3-O-Acetylglycerinsäure (<u>82</u>) und 2-O-Acetylglycerinsäure (<u>83</u>) im Gemisch	83
3.3.4. Synthese von Glycerinsäuremethylester (<u>89</u>)	84
3.3.5. Synthese von 3-O-(2-Hydroxypropionyl)- glycerinsäure (<u>88</u>) im Gemisch	84
3.4. Säureamide	86
3.4.1. Synthese von N-Formylglycin (<u>99</u>)	86

3.4.2. Synthese von N-Acetylglycin (<u>98</u>)	86
3.4.3. Synthese von Glykolsäurepropylamid (<u>93</u>)	86
3.4.4. Synthese von Erythronsäurepropylamid (<u>94</u>) und 2-Desoxyribonsäurepropylamid (<u>101</u>)	87
3.4.5. Synthese von Essigsäurepropylamid (<u>90b</u>)	87
3.4.6. Synthese von Ameisensäurepropylamid (<u>91b</u>)	88
3.5. Isolierung von N-Propyl-5-(hydroxymethyl)- pyrrol-2-aldehyd (<u>112</u>)	88
3.6. Im Arbeitskreis vorhandene Vergleichs- substanzen	89
4. Isolierung der Säuren aus dem Zucker/Amin- Umsetzungsgemisch	90
5. Auftrennung des Extrakts aus dem Glucose/Glycin- Umsetzungsgemisch	90
5.1. Vortrennung	90
5.2. Isolierung des Esters <u>64</u>	91
5.3. Isolierung der Ester <u>82</u> und <u>83</u>	91
5.4. Weitere Reaktionsprodukte	92
6. Oxidative Spaltung von 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy- 6-methyl-4H-pyran-4-on (<u>5</u>) und 4-Hydroxy-2,5- dimethyl-3(2H)-furanon (<u>59</u>)	92
7. Herstellung von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)- pyrrol-1-norleucin (<u>110</u>) als Vergleichssubstanz	93
7.1. Synthese von N ^ε -Acetyllysine (<u>111</u>)	93
7.2. Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Ausbeute an N-Propyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol- 2-aldehyd (<u>112</u>)	93
7.3. Herstellung von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-	

pyrrol-1-(N ^ω -acetyl)-norleucin (<u>113</u>)	93
7.4. Abspaltung der Acetylgruppe und Reinigung von <u>110</u>	94
7.4.1. Basenhydrolyse und Trennung an Kiesel- gelplatten	94
7.4.2. Enzymhydrolyse und HPLC-Reinigung	95
8. Umsetzungen von Rinderserumalbumin mit Glucose	96
9. Aufarbeitung der Proteinlösungen	96
9.1. Dialyse	96
9.2. Hydrolyse	96
9.3. HPLC-Vortrennung des Proteinhydrolysats	96
10. Nachweisverfahren für <u>110</u> nach der Vortrennung	97
10.1. Thiobarbitursäuretest	97
10.2. Aminosäure-Analysator	97
10.3. Fluoreszenzreaktion und HPLC/Fluorimeter bzw. HPLC/UV	98
10.4. HPLC/UV	98
10.5. MS/MS	99
11. Katalytische Reduktion von N-Propyl- 2,5-di- (hydroxymethyl)-pyrrol (<u>118a</u>)	99
11.1. Natriumborhydrid-Reduktion von N-Propyl-5- (hydroxymethyl)-pyrrol-2-aldehyd (<u>112</u>)	99
11.2. Katalytische Reduktion von <u>118a</u> zu N-Propyl- 2,5-di(hydroxymethyl)-pyrrolidin (<u>119a</u>)	100
Literaturverzeichnis	101
Lebenslauf	105



THEORETISCHER TEIL

A. Einleitung

Im Jahr 1912 berichtete der Franko-Algerier L.C. Maillard über eine Reaktion zwischen Glucose und Glycin, in deren Verlauf unter Kohlendioxidabspaltung ein brauner Niederschlag gebildet wurde (1).

Dieser klassische Modellversuch war der Einstieg in eine intensive Erforschung der Reaktionen zwischen Hydroxycarbonyl-Verbindungen und Aminen. Aus der Tatsache, daß in fast allen Lebensmitteln reduzierende Zucker und Proteine und/oder freie Aminosäuren gleichzeitig vorhanden sind, ergibt sich die Bedeutung der nach ihrem Entdecker benannten Maillard-Reaktion für die Lebensmittelchemie.

Schon bei Raumtemperatur, besonders aber beim Erhitzen, läßt sich ein vielseitiger Zuckerabbau unter Aminkatalyse feststellen. Gleichzeitig wird die Aminkomponente in viele Umwandlungsprodukte fest eingebaut.

Neben der Bildung von Farbstoffen, Aromastoffen (2), und antioxidativ wirkenden Reduktionen (3) waren die physiologischen Wirkungen der Produkte der Maillard-Reaktion aus Lebensmitteln Gegenstand vieler Untersuchungen. Die Schädigung der essentiellen Aminosäure Lysin bewirkt z.B. eine deutliche Qualitätseinbuße bei Proteinen hitzebehandelter Nahrungsmittel (4).

Darüberhinaus werden im Verlauf der Maillard-Reaktion antibakterielle, mutagene, enzyminhibierende und nephrotoxische Substanzen gebildet (5-8).

Immer größeres Interesse aus medizinischer Sicht gewinnt die Maillard-Reaktion in vivo. Proteine mit großen biologischen

Halbwertszeiten im menschlichen Körper wie z.B. Augenlinsenprotein werden an den Lysinseitenketten verändert. Diabetiker mit ihrem erhöhten Blutzuckerspiegel sind diesen Reaktionen deutlich stärker ausgesetzt (9).

Um die komplexen Amino-Carbonyl-Reaktionen zu studieren, bedient man sich auch heute noch einfacher Modellgemische. Man erhitzt typischerweise einen Zucker und eine Aminosäurekomponente in gepufferter, wäßriger Lösung in einem pH-Bereich von 4-7. Anschließend versucht man, die daraus gewonnenen Erkenntnisse auf Reaktionen in Lebensmitteln oder auf Reaktionen von Körperproteinen mit den im Organismus vorhandenen Zuckern zu übertragen.

Auf diese Weise sind durch die Identifizierung von Zwischenprodukten auch genauere Aussagen über allgemeine Reaktionsprinzipien der Maillard-Reaktion und über Bildungsmechanismen einzelner Umsetzungsprodukte möglich (10,11).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung polarer, niedermolekularer Reaktionsprodukte von Glucose/Glycin-Umsetzungsgemischen. Mit Hilfe von Derivatisierungsverfahren wie Silylierung oder Acetylierung sind auch diese Substanzen einer gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchung zugänglich.

Desweiteren sollte ein proteingebundenes Zuckerumwandlungsprodukt der Aminosäure Lysin nachgewiesen und für diese Substanz ein allgemein anwendbarer Analysengang entwickelt werden.

1. Einführung

Die bislang am gründlichsten untersuchten Produkte der Maillard-Reaktion sind flüchtige, unpolare Verbindungen. Diese lassen sich an Kapillarsäulen gaschromatographisch selbst in kleinen Mengen und komplexen Mischungen auftrennen und massenspektrometrisch identifizieren. Um auch die in nur geringen Mengen entstehenden Substanzen nachzuweisen, wird in der Regel eine Vorfractionierung des Reaktionsgemisches durchgeführt. Gleichzeitig erreicht man eine Anreicherung der einzelnen Umsetzungsprodukte.

Häufig wurden Zucker/Amin-Umsetzungsgemische mit Methylenchlorid oder Essigsäureethylester extrahiert. Damit konnten die extrahierbaren Reaktionsprodukte von der Hauptmenge der polaren Substanzen und des nichtumgesetzten Zuckers abgetrennt werden. Die Arbeitsgruppe um Theander wählte eine Vorfractionierung über Sephadex-Säulen und konnte so auch polarere, niedermolekulare Produkte finden (12).

Hiebl beschrieb 1987 die Extraktion eines relativ konzentrierten Glucose/Glycin-Gemisches mit Acetonitril/Essigester (1:1, v/v) (13). Ich untersuchte auch die Gefriertrocknung von Zuckerumsetzungsgemischen. Nach dem Aufkochen des Lyophilisats mit Methanol wird von unlöslichen Bestandteilen abfiltriert. Bei beiden Methoden werden die polaren Substanzen in vergleichbarem Ausmaß extrahiert, wobei die weitgehende Abtrennung von überschüssigem Zucker gewährleistet ist.

Für die gaschromatographische Analyse ist nun aber eine Derivatisierung der polaren Substanzen zur Erhöhung der Flüchtigkeit

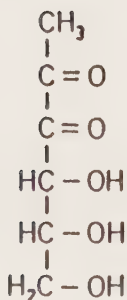
notwendig. Ich wählte dazu die Silylierung in Pyridin, da diese einfach durchzuführen ist und bei fast allen OH-gruppentragenden Substraten rasch und quantitativ abläuft.

Die Identifizierung der Substanzen erfolgte mit Hilfe eines Massenspektrometers. Aus Massenspektren trimethylsilylierter Verbindungen läßt sich meistens über den typischen M^+-15 -Peak die Molekülmasse ermitteln. M^+-15 entspricht der Abspaltung einer Methylgruppe aus der Trimethylsilylstruktur.

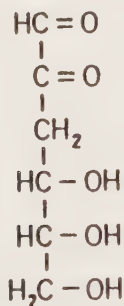
Das Fragmentierungsmuster ist aber häufig uncharakteristisch, so daß definierte Strukturelemente nur selten zugeordnet werden können.

2. Zuckerabbau in der frühen Phase der Maillard-Reaktion

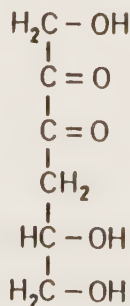
Hexosen durchlaufen bei ihrem Abbau nach einmaliger Wasserabspaltung die sehr reaktionsfähigen Dicarbonylverbindungen 1, 2 und 3 (10). Diese können mit oder ohne Katalyse eines Amins entstehen.



1

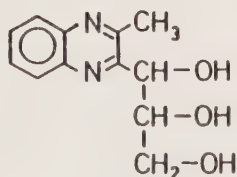
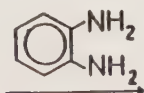
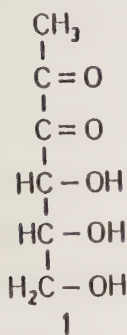


2



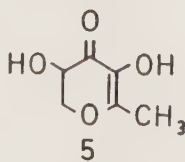
3

Bislang war lediglich 2 als Zwischenprodukt des frühen Zuckerabbaus in Hexose/Amin-Reaktionsgemischen nachgewiesen worden. Vor kurzem gelang es aber Beck, auch 1 durch eine Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin als stabiles Quinoxalinderivat 4 analytisch zu fassen (14).



4

Über die Dicarboxylverbindungen 1-3 können relativ stabile Produkte der Maillard-Reaktion wie z.B. das 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on (5) erklärt werden. Substanz 5 wurde schon in vielen Lebensmitteln gefunden (15,16).



5

Die Dicarboxylverbindungen sind aber auch mögliche Ausgangssubstanzen für niedermolekulare, polare Verbindungen, die oft unter C-C-Spaltung und Veränderung der Oxidationsstufe entstehen.

3. Polare Zuckerumwandlungsprodukte

3.1. Zucker/Amin-Modellgemische und Methodik

Ich wählte zur Untersuchung ein Gemisch aus äquimolaren Mengen an Glucose und Glycin in bei pH 7 gepufferter, wäßriger Lösung und erhitze 45 Minuten am Rückfluß. Daneben setzte ich die Disaccharide Lactose oder Maltose mit Glycin unter identischen Bedingungen um.

Nach Extraktion der dunkelbraunen Reaktionslösung der Glucose/Glycin-Umsetzung mit einem Acetonitril/Essigester-Gemisch und Silylierung erhielt ich zunächst folgendes Gaschromatogramm:

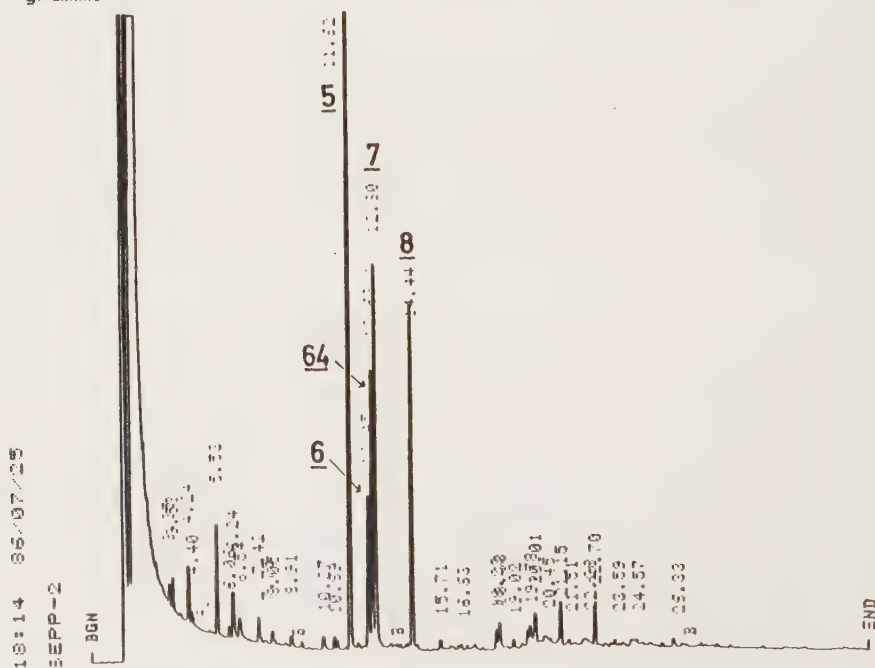
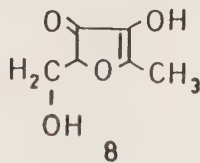
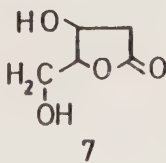
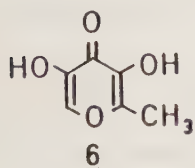


Abb.1: Gaschromatogramm eines mit Acetonitril/Essigester ausgeschüttelten und silylierten Glucose/Glycin-Umsetzungsgemisches

Mit Vergleichssubstanzen konnte ich die Hauptprodukte durch die Zuspritzmethode am GC mit zwei unterschiedlichen Säulen und schließlich mit Hilfe von Massenspektren identifizieren. Es handelte sich um Substanz 5, dessen Oxidationsprodukt 6, das schon von Theander beschriebene 2-Desoxyribonolacton (7) (12) und 4-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-3(2H)-furanon (8), das 1987 von Hiebl aus Glucose/Glycin-Umsetzungsgemischen isoliert worden war (13).



Zur Identifizierung weiterer Umsetzungsprodukte trennte ich das extrahierte Substanzgemisch mehrfach an präparativen Kieselgelplatten auf. Auf diese Weise ließen sich einzelne Substanzen anreichern. Die Trennschritte wurden jeweils gaschromatographisch verfolgt.

Eine Abtrennung von Einzelsubstanzen aus dem komplexen Gemisch ist unter diesen Bedingungen allerdings schwierig. Daher muß stets ein Vergleich mit den massenspektrometrischen Daten synthetisierter Substanzen zur Strukturabsicherung stattfinden. Gleichzeitig setzte ich zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen einzelne Zuckerumwandlungsprodukte unter definierten Bedingungen um. Als Aminkomponente wählte ich dazu Glycin oder Propylamin. Bei letzterem sind die Reaktionsprodukte sowohl unpolarer als auch flüchtiger und daher nach Extraktion leichter am

GC nachweisbar. In wenigen Fällen wurde als sekundäres Amin Piperidin verwendet.

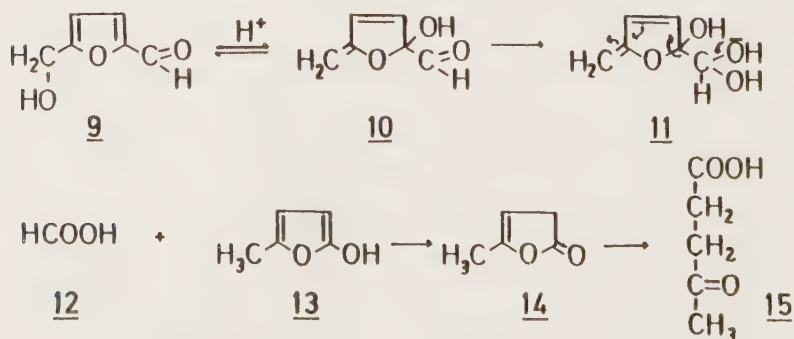
Auf diese Weise lassen sich in den Modellumsetzungsgemischen u.a. Säuren, Lactone, Ester und Säureamide nachweisen.

3.2. Säuren und Lactone

3.2.1. Säuren

Die Bildung von kurzkettigen Carbonsäuren aus Zuckern ist bisher unter verschiedenen Reaktionsbedingungen beobachtet worden.

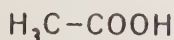
Wird Glucose einige Stunden in saurer, wäßriger Lösung am Rückfluß erhitzt, findet man als Hauptprodukt neben Hydroxymethylfurfural (9) v.a. dessen Folgeprodukt Laevulinsäure (15) (17). Nach einer säurekatalysierten Abspaltung der allylischen OH-Gruppe kann sich an der C2-Position des Furanrings wieder eine OH-Gruppe addieren (Zwischenprodukt 10).



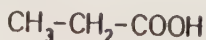
Bildet der Aldehyd das Hydrat 11, kann eine C-C-Spaltung erfolgen, wobei Ameisensäure (12) und 2-Hydroxy-5-methylfuran (13)

entstehen. 13 tautomerisiert zum Lacton 14, das nach säurehydrolytischer Ringöffnung in die Laevulinsäure (15) übergeht. Shaw et al. erhitzen Fructose in wäßriger Lösung bei pH 1-3 und erhielten neben relativ großen Mengen Laevulinsäure (15) auch Ameisensäure (12) und Essigsäure (16) (18).

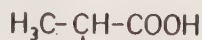
Nach dem Erhitzen von Saccharose unter alkalischen Bedingungen identifizierten sie neben anderen Produkten Essigsäure (16), Propionsäure (17) und Milchsäure (18) (19).



16



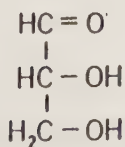
17



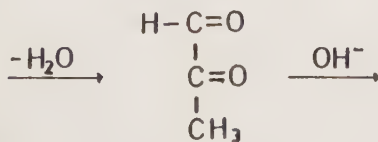
18

Sie schlossen daraus, daß bei der Erhitzungstemperatur von 100°C ein Teil der Saccharose zu den Hexosen hydrolysiert wird, die dann niedermolekulare Bruchstücke bilden können. Ein Kontrollversuch bei pH 7,2 ergab fast keine Produktbildung.

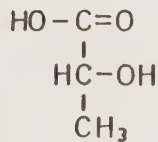
Feather und Harris interpretierten Milchsäure (18) als Benzilsäureumlagerungsprodukt des Methylglyoxals (20), das durch Wasserabspaltung aus Glycerinaldehyd (19) entsteht. 19 kann infolge einer Retro-Aldol-Spaltung von Hexosen im alkalischen Milieu auftreten (17).



19

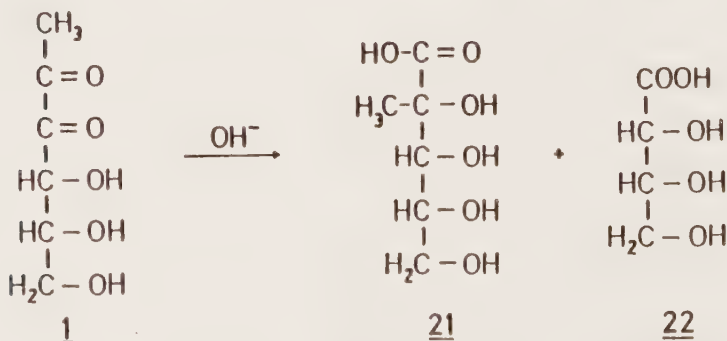


20



18

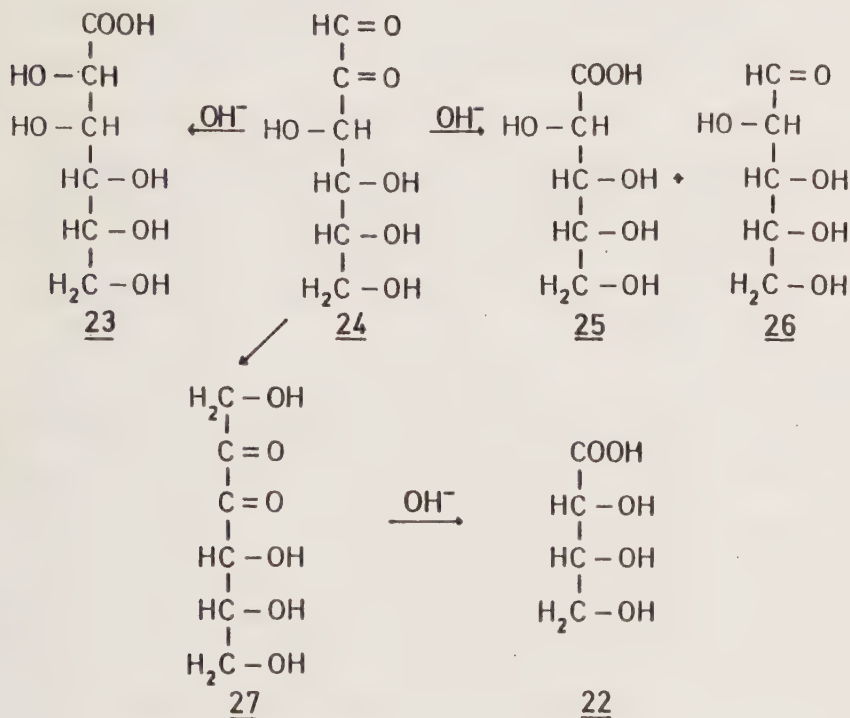
Ishizu et al. untersuchten α -Dicarbonylverbindungen aus Hexosen als Zwischenstufen bei der Saccharinsäurebildung unter alkalischen Bedingungen. Sie setzten die aus ihrem Osazon unter Säurekatalyse zwischenzeitlich in Lösung erhaltene 1-Desoxy-D-erythro-2,3-hexodiulose (1) sofort bei Raumtemperatur mit verschiedenen Basen um (20). Die Hauptprodukte der Reaktion waren die Glucosaccharinsäure (21) und Erythronsäure (22). Während das Benzilsäureumlagerungsprodukt 21 bei der Verwendung von Calciumhydroxid als Base überwog, wurde in der mit Natronlauge alkalisierten Lösung deutlich mehr Erythronsäure (22) gebildet.



Die Autoren machten über den Spaltungsmechanismus jedoch keine Angaben.

Einen ähnlichen Versuch führten Lindberg und Theander schon 1968 mit D-Glucoson (24) als Dicarbonylkomponente durch (21). Mit Calciumhydroxid als Base lief v.a. die Umlagerung zur D-Mannonsäure (23) ab. Dagegen identifizierten die Autoren bei Verwendung von Natriumhydroxid in erster Linie das Spaltprodukt Arabinonsäure (25) neben Erythronsäure (22), die nach Tautome-

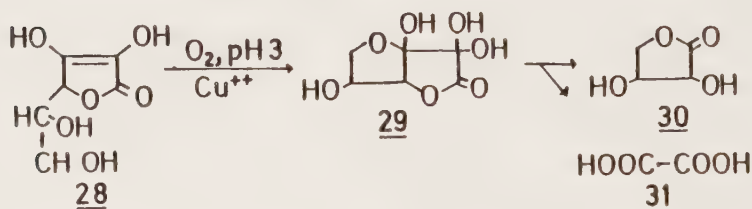
risierung von 24 aus der 2,3-Dicarbonylverbindung entstanden sein kann.



Außerdem wurde Arabinose (26) im Reaktionsgemisch dünn-schicht-chromatographisch nachgewiesen. Lindberg und Theander nahmen daher an, daß die Spaltung von α -Dicarbonylverbindungen in alkalischer Lösung zu einer Carbonsäure und einem Aldehyd und damit zu vier verschiedenen Reaktionsprodukten führen kann. Dies wurde allerdings nicht weiter untersucht.

Die oxidative Spaltung einer Dicarbonylverbindung zu zwei Carbonsäuren in saurer, wäßriger Lösung wiesen Pfeilsticker und Marx am Beispiel der Ascorbinsäure (28) nach (22). In Anwesen-

heit katalytischer Mengen an Cu(II)-Salzen und bei Belüftung des Reaktionsgemisches wird das Redukton 28 rasch zur Dehydroascorbinsäure (29) oxidiert, die in bicyclischer Form vorliegt.

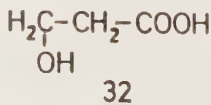


Nach hydrolytischer Öffnung des Lactons findet dann bevorzugt die Oxidation zum Threonsäurelacton (30) und zu Oxalsäure (31) statt.

Es stellte sich nun die Frage, ob die oben dargestellten Reaktionsabläufe auch unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion in einem pH-Bereich von 4-7 beobachtet werden können.

Hayase und Kato fanden in einem mit Diethylether extrahierten Glucose/Butylamin-Umsetzungsgemisch in geringen Mengen Propionsäure (17) (23).

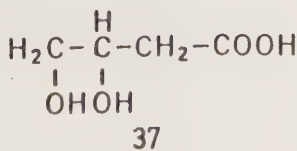
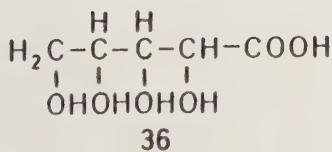
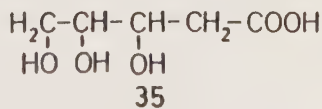
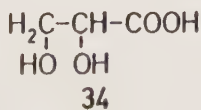
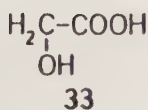
Theander et al. trennten eine 120 Stunden in schwach saurer Lösung erhitzte Mischung von Glucose und Glycin nach Gelfiltration schichtchromatographisch auf (12). Dabei konnten sie Milchsäure (19) und β -Hydroxypropionsäure (32) isolieren.



Ich behandelte nun zur gezielten Isolierung der Säuren ein Glucose/Glycin-Reaktionsgemisch mit einem stark basischen Ionenaustauscher. Zuvor mußten aber das im Überschuß vorhandene Puffersalz Phosphat und unverändertes Glycin möglichst vollständig abgetrennt werden, um eine ausschließliche Belegung des Ionenaustauschers mit diesen Substanzen zu verhindern.

Dies geschah durch Elution der einrotierten Reaktionslösung mit heißem Methanol. Art und Menge der dann erfaßbaren Säuren bzw. deren Salze waren somit von ihrem Löslichkeitsverhalten in Methanol abhängig.

Auf diese Weise konnte ich im Glucose/Glycin-Umsetzungsgemisch nach Silylierung Milchsäure (18), Glycolsäure (33), β -Hydroxypropionsäure (32), Glycerinsäure (34), Erythronsäure (22), 2-Desoxyribonsäure (35) sowie Ribonsäure (36) gaschromatographisch-massenspektrometrisch nachweisen. Außerdem waren noch Reste von Phosphat und Glycin zu finden. Erstaunlicherweise war am Ionenaustauscher trotz gründlichem Waschen mit Wasser eine gewisse Menge des Dihydropyranons 5 und auch Glucose adsorbiert worden.



In Lactose/Glycin-Reaktionslösungen fand ich zusätzlich noch größere Mengen an 2-Desoxyerythronsäure (37).

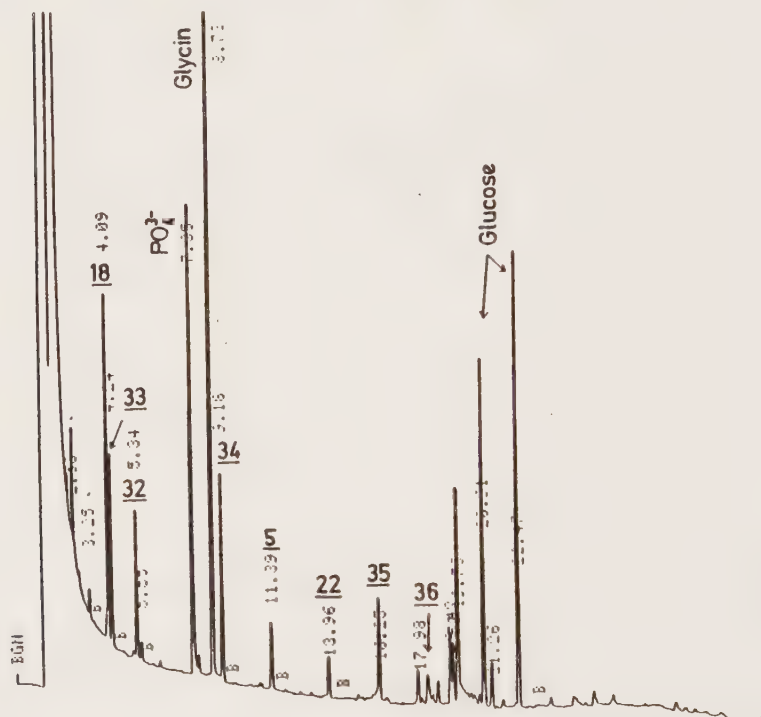
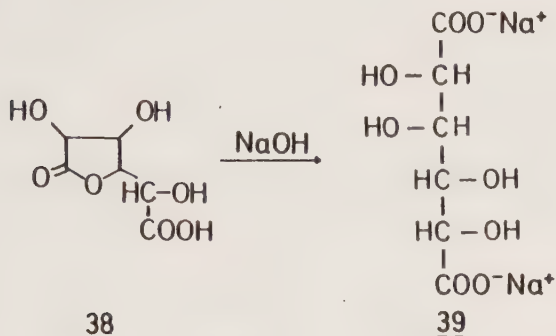


Abb.2: Gaschromatogramm der mit einem Ionenaustauscher isolierten Säuren eines Glucose/Glycin-Umsatzungspräparates

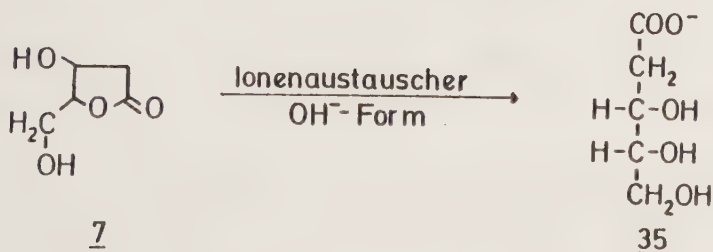
In der auf 100°C erhitzten, am Ende der Reaktionszeit leicht sauren Glucose/Glycin-Lösung liegen 4-Hydroxycarbonsäuren fast vollständig als γ -Lactone vor.

Bei Zugabe von zu den Lactonen äquimolaren Mengen Base lassen sich aber schon bei Raumtemperatur z.T. quantitativ die offenkettigen Säuren freisetzen. Hicks zeigte dies am Beispiel des D-Mannofuranuro-6,3-lactons (38), indem er den Verlauf der al-

Kalischen Hydrolyse zum Natriumsalz der D-Mannuronsäure (39)
hochdruckflüssigchromatographisch verfolgte (24).

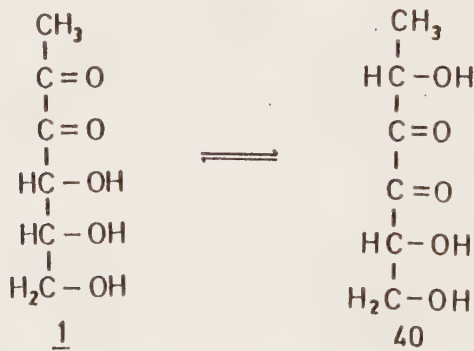


Ein ähnliches Ergebnis erhielt ich beim Rühren einer wäßrigen Lösung von 2-Desoxyribonolacton 7 mit einem stark basischen Ionenaustauscher. Nach Silylierung der vom Austauschharz eluierten Substanzen fand ich am GC eine beträchtliche Menge der 2-Desoxyribonsäure (35).

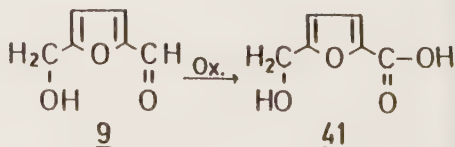
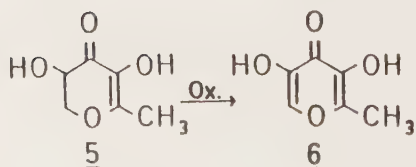


Dies zeigte, daß die im Glucose/Glycin-Reaktionsgemisch gefundenen 4-Hydroxycarbonsäuren unter den Versuchsbedingungen aus ihren Lactonen (s. Kap. 3.2.2.) freigesetzt worden sein konnten.

Die Bildung niedermolekularer Säuren aus Zuckern unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion wurde bislang z.T. mit einer oxidativen Spaltung von α -Dicarbonylverbindungen wie 1, 2, 3 oder daraus durch Tautomerisierung hervorgegangene Isomere wie z.B. 40 erklärt.

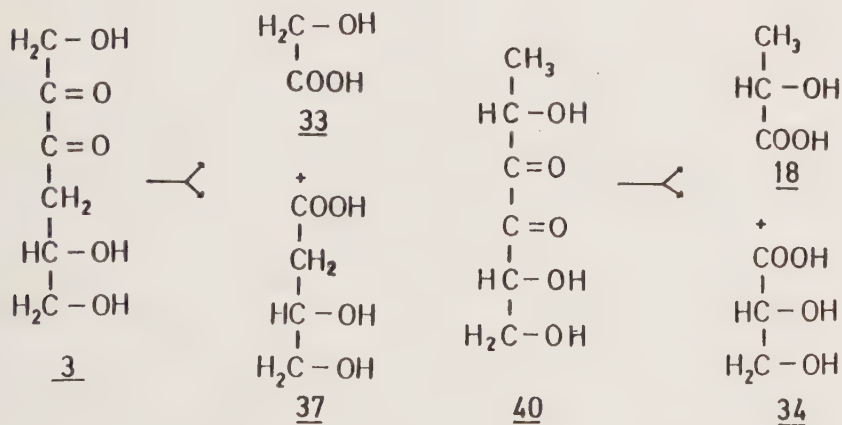


Dabei beriet man sich auf Modellumsetzungen von Machell und Richards aus dem Jahre 1960 (25). Sie hatten Dicarbonylverbindungen wie z.B. 2 mit 30%igem Wasserstoffperoxid eine Stunde bei 100°C umgesetzt und jeweils zwei Säuren nachgewiesen. Die oxidative Spaltung erfolgte zwischen den Carbonylgruppen. Auch bei Zucker/Amin-Umsetzungen hat man verschiedene Oxidationsvorgänge beobachtet. So wird das Dihydropyranon 5 relativ rasch - wahrscheinlich unter dem Einfluß von Luftsauerstoff - zum Pyranon 6 oxidiert. Das Auftreten von 5-Hydroxymethyl-2-



furancarbonsäure (41) erklärt sich durch Oxidation von Hydroxymethylfurfural (9).

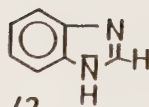
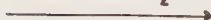
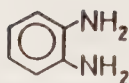
Die Bildung der Säuren 33 und 37 aus der Dicarbonylverbindung 3 oder der Säuren 18 und 34 aus der Dicarbonylverbindung 16 könnte theoretisch mit einer oxidativen Spaltung erklärt werden.



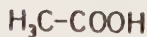
Die bei oxidativen Spaltungen ebenfalls zu erwartenden Bruchstücke Ameisensäure (12) und Essigsäure (16) konnten nach Silylierung nicht erfaßt werden, da sie als relativ flüchtige Verbindungen mit dem Lösungsmittel- bzw. Derivatisierungsmittel-Peak zusammenfallen. Beck konnte sie aber nach einer Abfangreaktion mit o-Phenyldiamin als stabile Benzimidazole 42 und 43 in Maillard-Reaktionsgemischen eindeutig nachweisen (14).



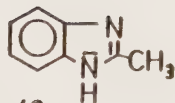
12



42

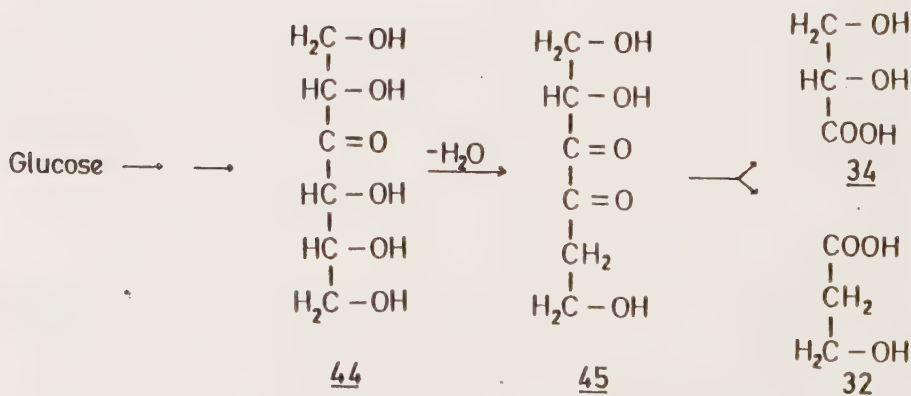


16



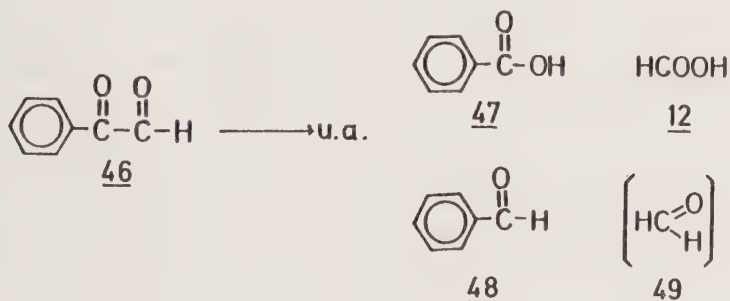
43

β -Hydroxypropionsäure (32) ließe sich formal aus der Dicarboxylverbindung 45 erklären, die nach Wasserabspaltung aus der tautomerisierten Glucose 44 entstehen kann.

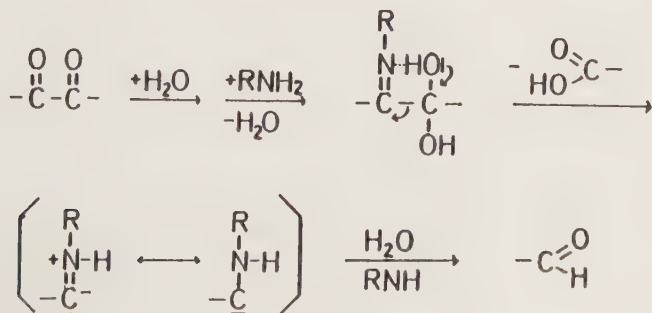


Ähnlich starke Oxidationsmittel, wie sie Machell und Richards für die oben erwähnten Versuche verwendeten (30%iges H_2O_2), treten im Verlauf der Maillard-Reaktion allerdings nicht auf.

Fernemalm formulierte schon 1978 den Mechanismus einer hydrolytischen α -Dicarbonylsplaltung in Aldehyd und Carbonsäure (26). Er konnte diesen allerdings experimentell nicht belegen. Beck setzte Phenylglyoxal (46) als nicht-enolisierende α -Dicarbonylverbindung unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion um (14). Er fand u.a. sowohl Ameisensäure (12) und Benzoesäure (47) als auch Benzaldehyd (48). Der reaktive Formaldehyd (49) war unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht eindeutig nachweisbar.

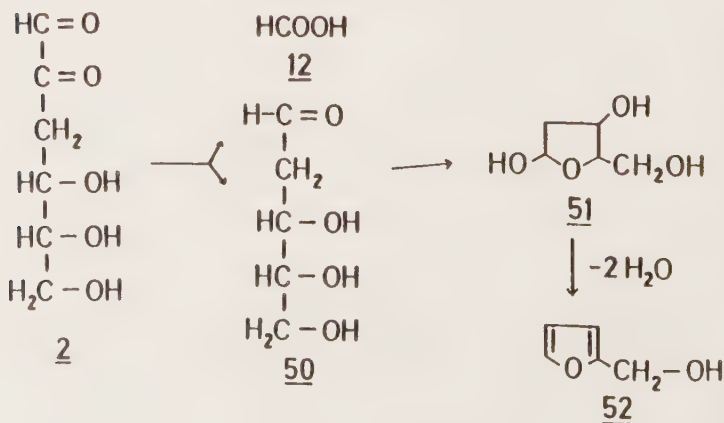


Beck schlug daraufhin einen aminkatalysierten Spaltungsmechanismus vor, der auch durch andere Versuchsergebnisse gestützt wurde:



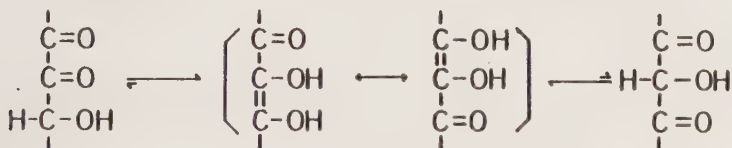
Da aus beiden Carbonylgruppen die Carbonsäure entstehen kann, lassen sich zunächst alle in Modellansätzen gefundenen Säuren auf diese Weise erklären. Es bleibt allerdings im unklaren, ob aus einer der beiden Carbonylgruppen bevorzugt die Carbonsäure gebildet wird. Die bei der Spaltung entstehenden Aldehyde sind sehr reaktionsfähige Verbindungen, die z.B. unter Kondensation schnell weiterreagieren können und am Aufbau der hochmolekularen Melanoidine beteiligt sind (27). Ihr Nachweis müßte daher z.B. mit Hilfe von Abfangreaktionen erfolgen.

Die Bildung von Furfurylalkohol (52) in Monosaccharid/Amin-, vor allem aber auch in Disaccharid/Amin-Umsetzungen belegt u.a. die vorgeschlagene Spaltung. 2-Desoxyribose (50) als Aldehydkomponente kann aus der α -Dicarbonylverbindung 2 entstehen. Liegt 50 als 5-Ring-Halbacetal 51 vor, kann durch zweimalige Wasserabspaltung der Furanring gebildet werden. Dies ließ sich durch Umsetzung von 2-Desoxyribose in Anwesenheit einesamins bei pH 7 in wäßriger Lösung zeigen, bei der als einziges Hauptprodukt der Furfurylalkohol (52) gebildet wurde.

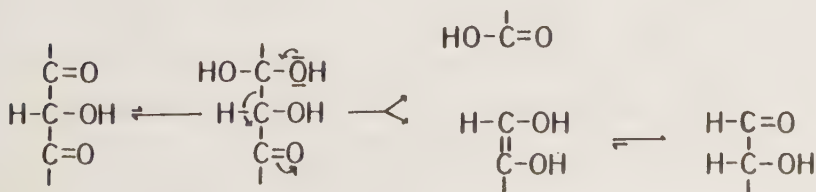


Die Tatsache, daß in Disaccharid/Amin-Umsetzungen wesentlich mehr Furfurylalkohol (52) als in Monosaccharid/Amin-Umsetzungen entsteht, läßt sich anhand dieses Mechanismus allerdings nicht erklären.

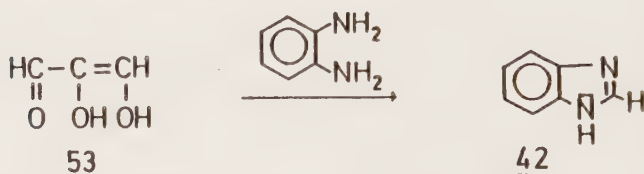
Nun ist aber von den Desoxyhexosulosen 1-3 nur 2 eine α -Dicarbonylverbindung, die in α -Stellung zu den beiden Carbonylgruppen keine OH-Gruppe trägt. Im Gegensatz zu 2 können sich 1 und 3 nach ihrer Entstehung aus dem Zucker in die entsprechenden aci-Reduktone umlagern.



Acid-Reduktone können z.B. mit α -Phenylendiamin nicht mehr in Guinoxaline übergeführt werden (14). Sie sind als vinyloge Carbonsäuren mesomeriestabilisiert und weisen eine geringe Carbonylaktivität auf. Trotzdem ist es denkbar, daß im Gleichgewicht in geringen Mengen auch die offenkettige 1,3-Dicarbonylverbindung vorliegt. Ist dies der Fall, so ist ein nucleophiler Angriff eines Wassers oder Amins möglich. Neben der Rückreaktion kann es durch den Elektronenzug der zweiten Carbonylgruppe zur C-C-Spaltung kommen:



Beck konnte nach Umsetzung des Triosereduktions(53) mit *o*-Phenylendiamin in gepufferter, wäßriger Lösung das Benzimidazol der Ameisensäure nachweisen (14).



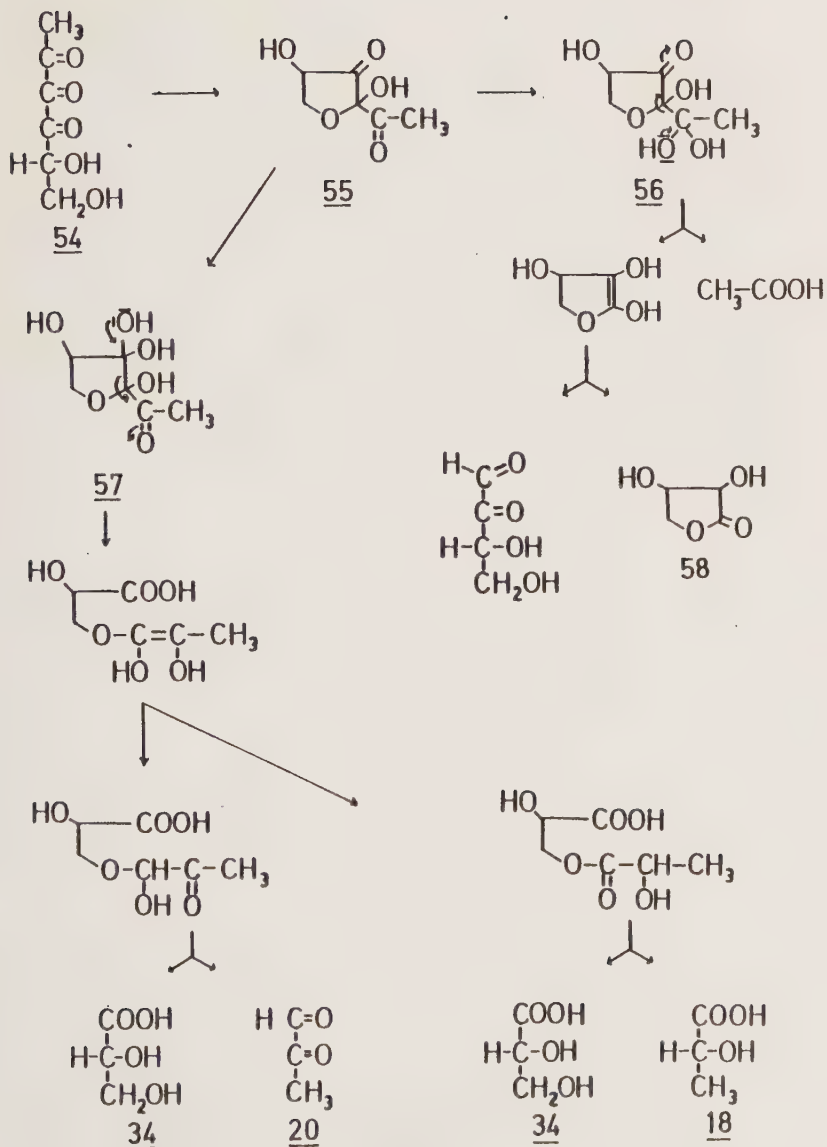
Inwieweit eine derartige C-C-Spaltung mengenmäßig in Maillard-Reaktionsgemischen eine Rolle spielt, läßt sich jedoch nicht abschätzen.

Acil-Reduktone sind leicht oxidierbar. Im Zuge der Maillard-Reaktion können so zwischenzeitlich auch Tricarbonylverbindungen wie z.B. 54 auftreten (s. Schema 1). Ist dabei die mittlere Carbonylfunktion durch Bildung eines cyclischen Halbacetals 55 blockiert, kann die 1,3-Dicarbonylverbindung nach Wasseranlagerung einer C-C-Spaltung unterliegen. Eine Wasseraddition ist hier leichter vorstellbar als bei den mesomeriestabilisierten acil-Reduktionen. Sie kann an beiden Carbonylfunktionen erfolgen (s. 56 und 57).

Im Verlauf der Reaktion kann aus der Hexosulose 54 eine Vielzahl von Folgeprodukten entstehen.

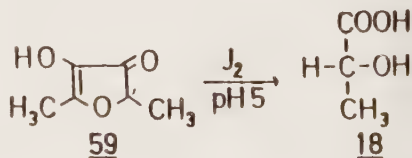
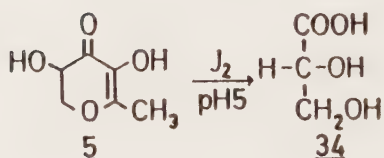
Neben den Säuren 18 und 34 können Aldehyde wie z.B. Methylglyoxal (20), aber auch Ester (s. Kap.3.3) oder Lactone wie das Erythrönsäurelacton (58) gebildet werden, die wiederum - in Abhängigkeit vom pH-Wert - einer hydrolytischen Spaltung unterliegen können.

Aber auch relativ stabil erscheinende Produkte der Maillard-

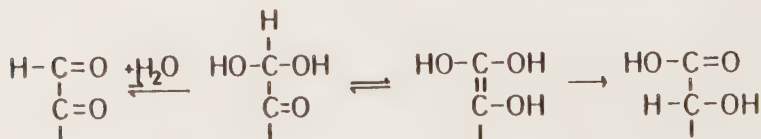


SCHEMA 1

Reaktion lassen sich unter milden Bedingungen oxidativ spalten. Ich setzte das Dihydropyranon 5 und Furanol (59) in wäßriger Lösung bei pH 5 mit äquimolaren Mengen an elementarem Jod bei Raumtemperatur um. Dabei werden die Ausgangsprodukte, die cyclische Reduktonether darstellen, fast quantitativ verändert. Nach Silylierung fand ich als Hauptprodukte aus 5 die Glycerinsäure(34), aus 59 die Milchsäure (18). Über den genauen Mechanismus dieser Oxidationsreaktionen kann hier keine Aussage gemacht werden. Eine Oxidation zur Tricarbonylverbindung zu Beginn der Reaktion ist aufgrund der Folgeprodukte jedoch anzunehmen.

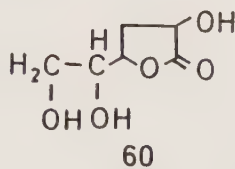


Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung von Säuren liegt in einer intramolekularen Disproportionierung von α -Keto-Aldehyden nach folgendem Schema:

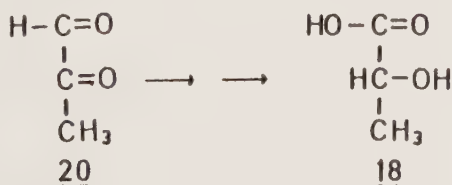


In Zucker/Amin-Reaktionsgemischen bei neutralem oder leicht saurem pH hat man das Metasaccharinsäurelacton(60) in relativ großen Mengen gefunden (12). Pernemalm sah darin das Produkt einer Benzilsäureumlagerung aus 2 (26). Corbett stellte 60

durch Umsetzen von 3-O-Methylglucose in wäßriger, alkalischer Lösung her (28).



Benzilsäureumlagerungen finden in erkennbarem Ausmaß jedoch nur im deutlich alkalischen Milieu statt, wobei das Hydroxid-Anion eine Carbonylgruppe nucleophil angreift. Wahrscheinlicher ist daher unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion die oben dargestellte Folge von Tautomerisierungen der hydratisierten Dicarbonylverbindung. Auf solche Weise kann z.B. Milchsäure (18) aus Methylglyoxal (20) entstehen:

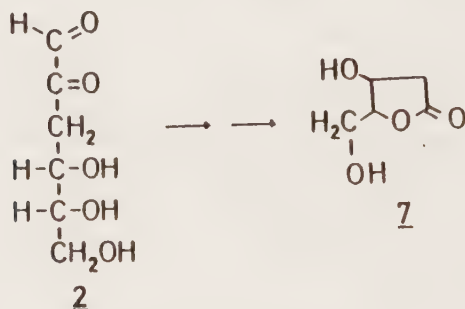


3.2.2. Lactone

4-Hydroxycarbonsäuren gehen beim Erhitzen in wäßriger Lösung leicht in 5-Ring-Lactone über. Es ist für die Produktbildung im Zuckeransatz also unerheblich, ob zuerst eine offenkettige Säure oder ob aus einer cyclischen Struktur direkt das Lacton entsteht.

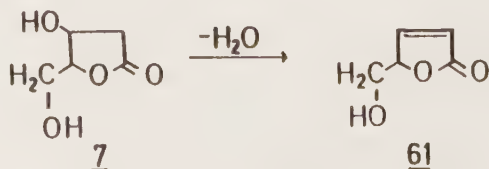
In der mit Acetonitril/Essigester extrahierten Glucose/Glycin-Reaktionsmischung erwies sich das Lacton 7 als eines der Hauptprodukte.

Es bildet sich vermutlich aus der α -Dicarbonylverbindung 2.



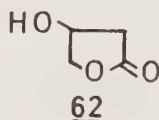
Da 2 kein α -Redukton bilden kann und die Wanderung einer Carbonylgruppe entlang der Zuckerkette verhindert ist, scheint die Dicarbonylsplaltung bevorzugt abzulaufen. Dies erklärt die große Menge an gebildetem Lacton 7 in Zucker/Amin-Umsetzungsgemischen.

Daraufhin stellte sich die Frage, ob das gesättigte Hydroxylacton 7 unter Wasserabspaltung auch in das ungesättigte Lacton 61 übergehen kann. Die C-H-Acidität der Methylengruppe in Nachbarschaft zur Carbonylfunktion des Lactons würde diese Wasserabspaltung begünstigen.



Die Synthese des Lactons 61 erfolgte nach Literaturangaben (29). Nach Silylierung verschiedener Zucker/Amin-Reaktionsgemische war 61 mit Hilfe der GC-MS-Technik nicht nachweisbar. Auch bei einer Umsetzung des reinen Lactons 7 mit Glycin oder Propylamin in gepufferter, wäßriger Lösung war das dehydratisierte Produkt nicht zu finden.

Neben dem 2-Desoxyribonolacton (7) und dem schon oben erwähnten Metasaccharinsäurelacton (60) fand ich im Modellansatz mit Glycin das Erythronsäurelacton (58) sowie in sehr geringen Mengen das 2-Desoxyerythronolacton (62). Letzteres war schon 1978 von Theander aus Glucose/Glycin-Reaktionsmischungen isoliert worden (12).



Das Lacton 62 ist ein Hauptprodukt in Disaccharid/Amin-Umsetzungsgemischen. Loidl fand es in relativ großer Menge nach Umsetzung von Maltose mit Methylamin in wäßriger Lösung (30). Die 4-Desoxyhexosulose (3) als wahrscheinliche Vorstufe des Lactons 62 wird aus Disacchariden offensichtlich in größeren Mengen gebildet als aus Monosacchariden.

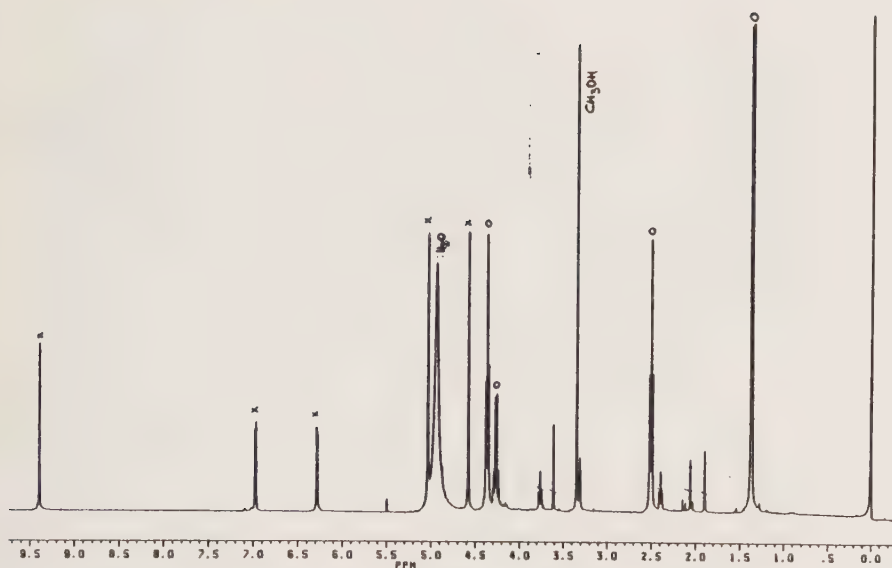
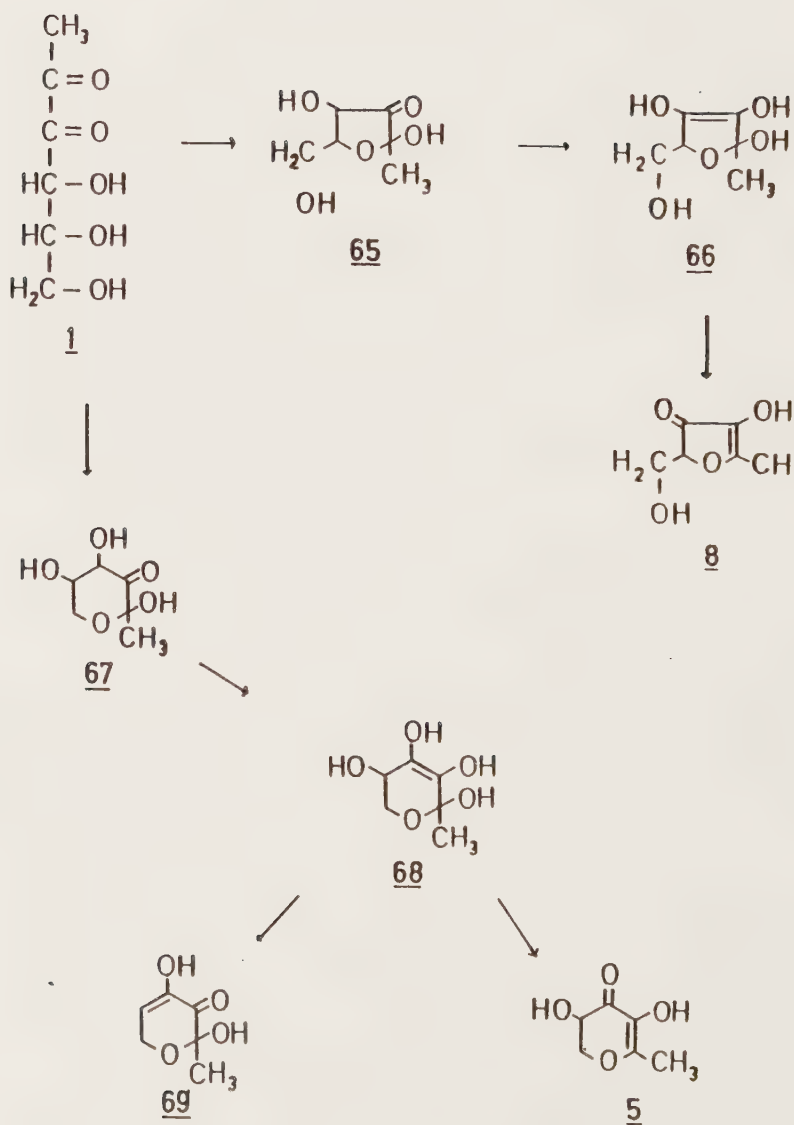


Abb. 3: ^1H -NMR-Spektrum (CD_3OD , 400 MHz) von 63 (Signale x) und 64 (Signale o) im Gemisch

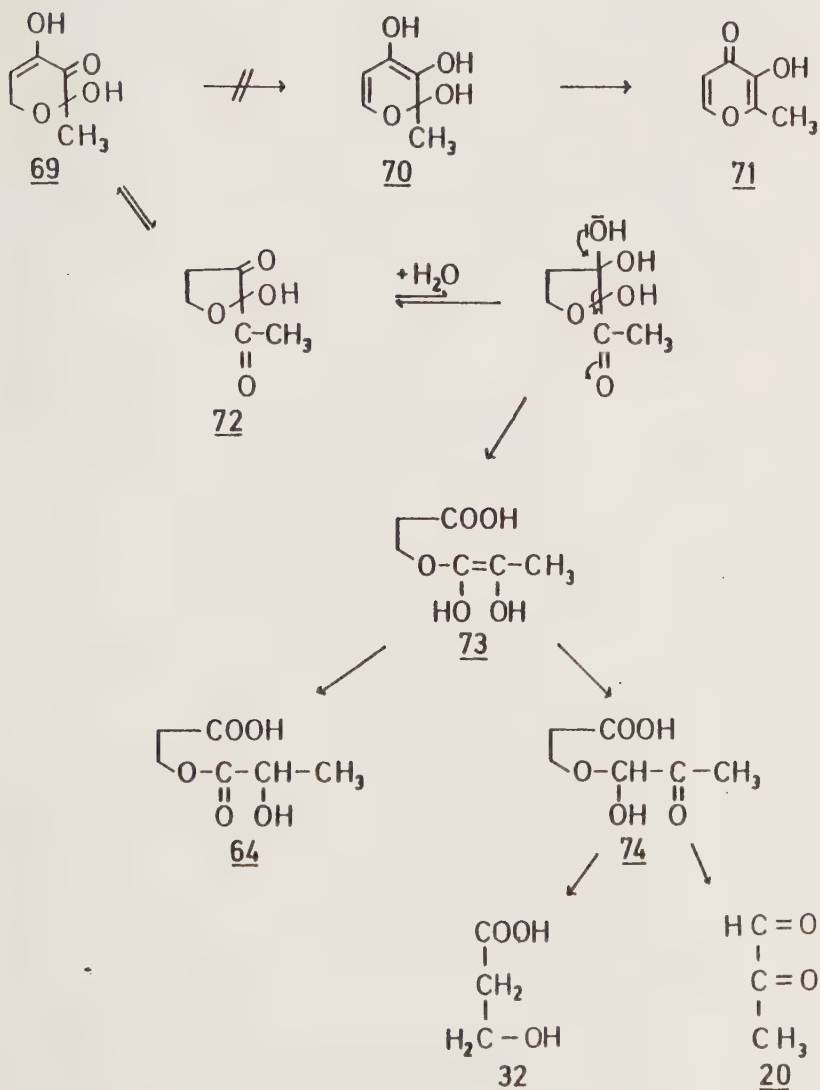
der 1-Desoxyhexosulose 1 handeln könnte.

Wichtigste bekannte Folgeprodukte der Dicarbonylverbindung 1 sind das Dihydropyranon (5) sowie das Furanon (8) (s. Schema 2). Beide Substanzen entstehen aus den cyclischen Halbacetalen 65 und 67. Die Carbonylgruppe am C3 der Zuckerkette kann nur nach einer Seite hin enolisieren. Aus den dann vorliegenden Endiolstrukturen 66 und 68 wird rasch Wasser abgespalten. Dies kann bei der Zwischenverbindung 68 theoretisch nach beiden Seiten hin erfolgen, da in α -Stellung zum Endiol jeweils OH- bzw. OR-Gruppen als Abgangsgruppen sitzen.

Bisher war jedoch bei Monosaccharid/Amin-Umsetzungen kein Folgeprodukt identifiziert worden, das auf eine OH-Abspaltung am C5 der Zuckerkette hingewiesen hätte. Das Dihydropyranon 5 ist



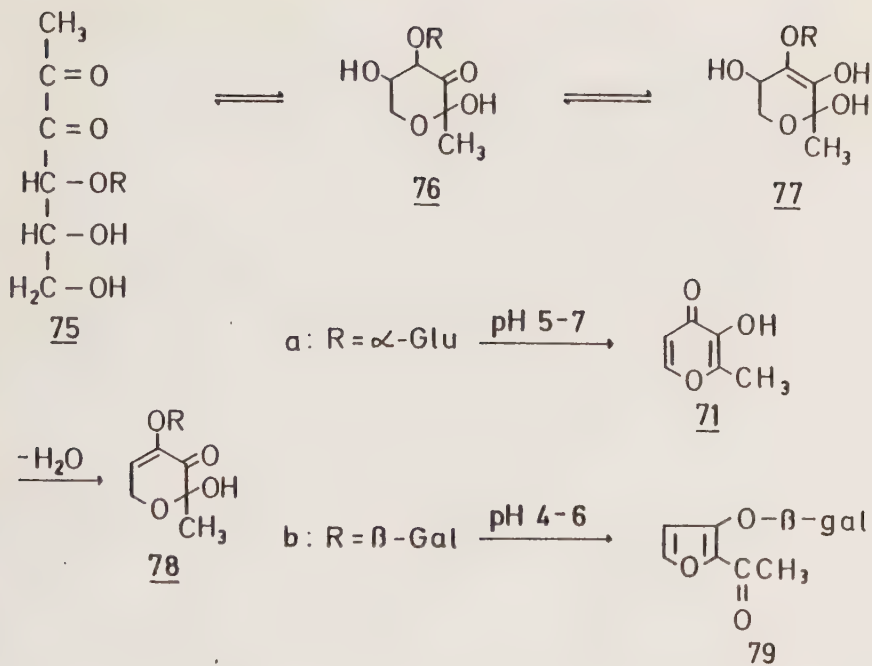
SCHEMA 2



SCHEMA 3

fast immer das Hauptprodukt der Maillard-Reaktion bei neutralem pH. Daher vermutete man, daß die Bildung dieses cyclischen acylduktonethers gegenüber der Zwischenverbindung 69 bevorzugt sei. Die Tatsache, daß aus Monosacchariden kein Maltol (71) entsteht, schien diese Vermutung zu bestätigen (s. Schema 3). Die Bildung des Esters 64 belegt nun, daß die Wasserabspaltung in beiden Richtungen ablaufen kann. Aus dem 6-Ring-Halbacetal 69 kann über die offenkettige Form auch das 5-Ring-Halbacetal 72 gebildet werden. Eine Tautomerisierung zur Verbindung 70 als Vorstufe des Maltols (71) findet offensichtlich nicht statt. Die dann vorliegende 1,3-Dicarbonylverbindung (72) kann nach Wasseranlagerung zwischen C3 und C4 der ursprünglichen Zuckerkette gespalten werden. Das dabei entstehende Endiol 73 tautomerisiert bevorzugt zum stabilen Ester 64. Falls die Tautomerisierung auch in die andere Richtung erfolgt, entsteht das Halbacetal 74, das in β -Hydroxypropionsäure (32) und Methylglyoxal (20) zerfällt.

Dieser Mechanismus wird durch entsprechende Disaccharidreaktionen bestätigt. Matsuura et al. isolierten 1984 die als Halbacetal vorliegende Dicarbonylverbindung 73a aus rotem Ginseng (31). Ihre Bildung erfolgt über die 1-Desoxyhexosulose 75 des Disaccharids. Nach Ringschluß zum Halbacetal 76 und Enolisierung zur Verbindung 77 ist zunächst eine Wasserabspaltung nur in einer Richtung zum Produkt 78 möglich. Beim Erwärmen wandelt sich 78 leicht in Maltol (71) um. Dies geschieht nach Abspaltung des zweiten, glykosidisch gebundenen Zuckers.



Ledl und Ellrich fanden kurze Zeit später das Lactose-Produkt 78b in Lactose/Glycin-Umsetzungsgemischen sowie durch polarographische Messungen in wärmebehandelter Milch (32).

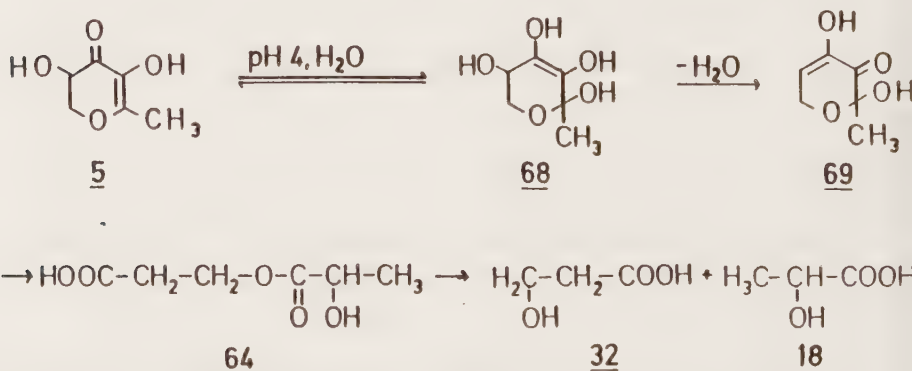
78b geht in einem pH-Bereich von 4-6 vollständig in Galaktosylisomaltol (79) über. Eine Galaktose-Abspaltung und nachfolgende Maltolbildung wurde nicht beobachtet. Sterische Gründe scheinen beim Zwischenprodukt 78a die Abspaltung der α -Glucose vom C4 zu fördern, während der β -Galaktose-Rest der Verbindung 78b erhalten bleibt und eine Ringverengung erfolgen kann.

Ich isolierte 78b nach Literaturangaben (32) aus Lactose/Glycin-Umsetzungen und spaltete den β -Galaktose-Rest enzymatisch ab. Als einziges Hauptprodukt entstand dabei der Ester

64, der über seine Retentionszeit nach Silylierung am GC und über das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum identifiziert wurde.

Damit kann das Halbacetal 67 als Zwischenstufe bei der Bildung des Esters 64 als gesichert gelten.

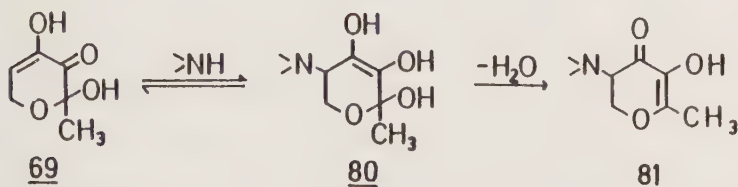
Zusätzlich setzte ich das Dihydropyranon 5 bei pH 4 in wäßriger Lösung mit und ohne Amin 1-4 Stunden um. In beiden Fällen konnte ich die Bildung des Esters 64 nachweisen. Beim längeren Erhitzen wird der Ester allerdings säurehydrolytisch gespalten und man findet größere Mengen der den Ester bildenden Hydroxycarbonsäuren 18 und 32.



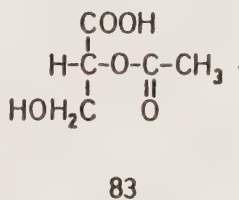
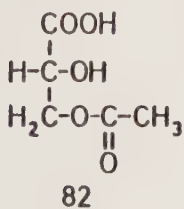
Es ist anzunehmen, daß nach säurekatalysierter Wasseraddition die Zwischenstufe 68 gebildet wurde, aus der der Ester 64 entstehen kann. In gepufferten Lösungen (pH 7) bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Amins ist diese Reaktion allerdings nicht zu beobachten.

Die Zwischenverbindung 69 stellt u.a. ein α,β -ungesättigtes Keton dar. Man könnte also erwarten, daß sich z.B. das im Reaktionsgemisch in großen Mengen vorhandene Amin an das Michael-

System addiert. Die GC/MS-Analyse verschiedener Zucker/Amin-Umsetzungen ergab allerdings keinen Hinweis auf die Bildung der Additionsverbindung 80 bzw. des dehydratisierten Folgeprodukts 81.

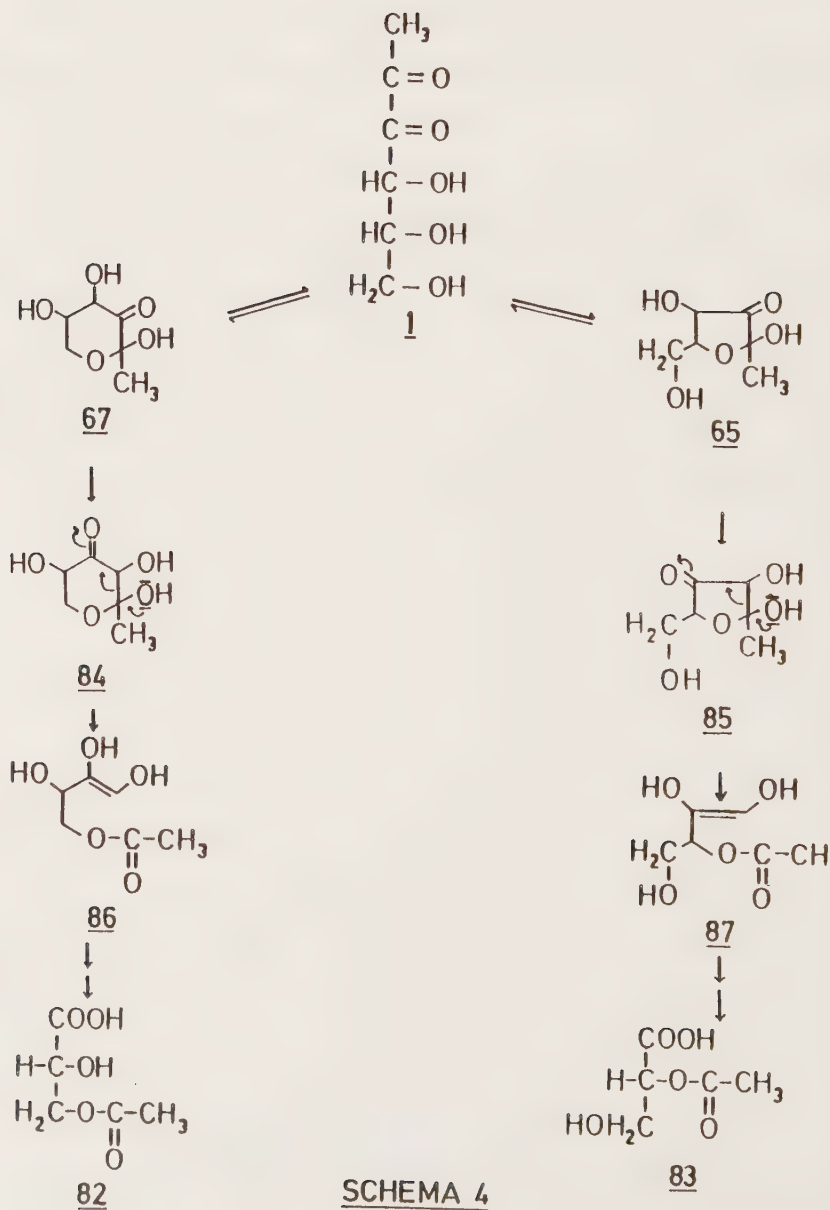


Bei der Umsetzung von Glucose mit Glycin konnte ich außerdem die Ester zwischen der Glycerinsäure und der Essigsäure 82 und 83 nachweisen.



Wiederum wies die endständige CH_3 -Gruppe auf ein Produkt der 1-Desoxyhexosulose 1 hin. Ein möglicher Mechanismus zur Bildung dieser Ester ist in Schema 4 angegeben.

Tautomerisieren die Halbacetale 67 und 65 zu den isomeren Carbonylverbindungen 84 und 85, so ist nach Wasseraddition eine 1,3-Diketonspaltung möglich. Nach einer Oxidation der Endirole 86 bzw. 87 zu Dicarbonylverbindungen könnten diese – wie in Kapitel 3.2.1. beschrieben – in die Ester 82 und 83 (als Säurekomponente) sowie Formaldehyd gespalten werden.



Die beiden Ester ließen sich als Trimethylsilyl-derivate am GC mit den verwendeten Säulen nicht vollständig auftrennen. Daß zwei Verbindungen dicht nebeneinander lagen, konnte man an der Ausbildung einer deutlichen Peakschulter erkennen.

Verwendet man - ausgehend von der Glycerinsäure (34) - verschiedene Acetylierungsmittel bzw. -bedingungen zur Herstellung der Vergleichesubstanzen, so entstehen die Säuren 82 und 83 in unterschiedlichen Mengenverhältnissen.

Dies läßt sich anhand der chemischen Verschiebung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erkennen. So liegt das Singulett der Acetylgruppe von 82 bei 2,2 ppm, das Dublett und das Triplet der Glycerinsäureprotonen überlagern sich im Bereich von 4,4-4,7 ppm. Das Singulett der Acetylgruppe von 83 liegt bei 2,3 ppm, das Dublett für die CH_2OH -Gruppe bei 4,1 ppm, das Triplet für das Proton am mittleren C-Atom der Glycerinsäure ist durch den Einfluß der Esterbindung nach 5,2 ppm tieffeldverschoben.

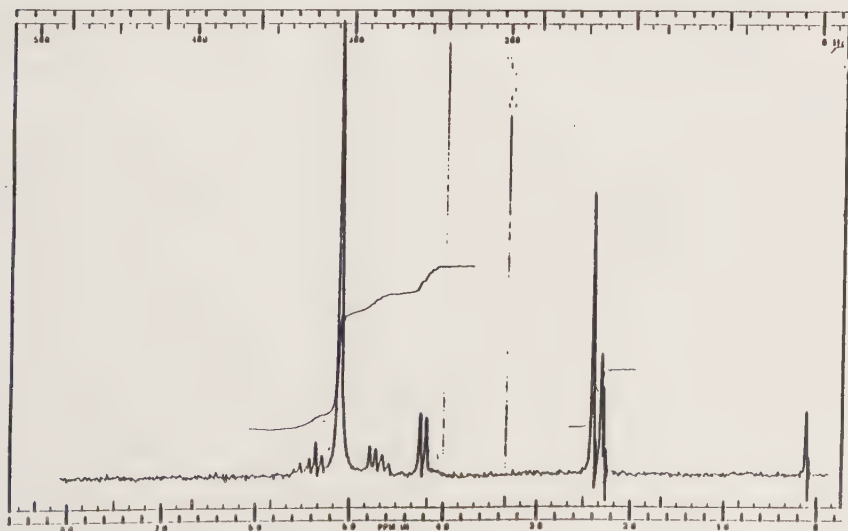
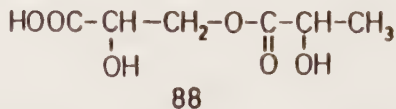


Abb. 4: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (60 MHz) von 82 und 83 in Gemisch

Aufgrund der GC- und ^1H -NMR-Spektren läßt sich das Mengenverhältnis der Ester 82 zu 83 im Glucose/Glycin-Umsetzungsgemisch mit ca. 3:1 angeben.

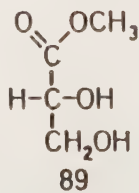
Wie in Schema 1 dargestellt, kann aus der oxidierten 1-Des-oxyhexosulose 1 auch der Milchsäureester 88 entstehen.



Nach saurer Veresterung von Glycerinsäure mit Milchsäure konnte im silylierten Gemisch eine Substanz mit der Masse 394 nachgewiesen werden. Das Massenspektrum dieser Substanz ist mit dem Spektrum einer aus dem Glucose/Glycin-Umsetzungsgemisch isolierten Substanz identisch.

Auch bei einer Oxidation des Dihydropyranons 5 mit J_2 in wäßrigem, leicht saurem Milieu findet man den Ester 88. Offensichtlich wird die Reduktonether-Struktur von Verbindung 5 zur Tricarbonylverbindung oxidiert und unterliegt nach 5-Ring-Bildung einer 1,3-Dicarbonylsplaltung (vgl. Schema 1).

Außerdem konnte ich im Glucose/Glycin-Gemisch den Glycerinsäuremethylester 89 eindeutig nachweisen, dessen Bildungsmechanismus jedoch unklar ist.

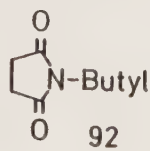
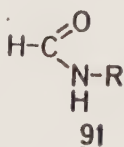
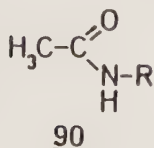


3.4. Säureamide

Hayase und Kato setzten Glucose mit N-Butylamin bei verschiedenen pH-Werten um und extrahierten die Reaktionsmischung mit Diethylether (23). Dabei verfolgten sie durch quantitative Auswertung von Gaschromatogrammen (Interner Standard) die Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit.

Bei pH 6,5 fanden sie größere Mengen sowohl an N-Butylacetamid (90a) als auch N-Butylformamid (91a) sowie Spuren von N-Butylsuccinimid (92).

Das Formamid erreichte schon nach 20 Minuten ein Maximum und nahm dann kontinuierlich ab, während sich das Acetamid im Verlauf der Reaktion anreicherte.

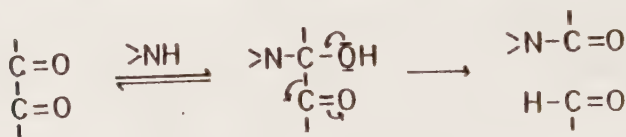


a: R = Butyl

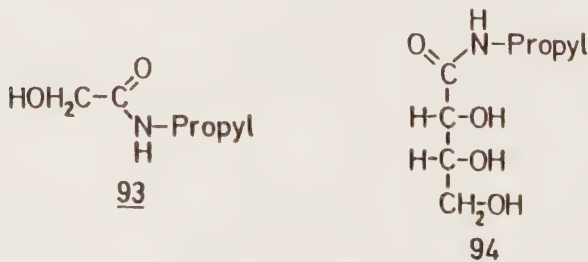
b: R = Propyl

Bei Umsetzungen von Glucose mit Propylamin bei pH 7 erhielt ich ebenfalls relativ große Mengen des N-Propylacetamids (90b) und des N-Propylformamids (91b). Diese Tatsache ließ auf ein allgemeines Bildungsprinzip schließen. Die Bildung der Amide ist allerdings von der eingesetzten Aminmenge abhängig. Bei einem Zucker/Amin-Verhältnis von 5:1 findet man die Säureamide nur noch in Spuren.

In Analogie zur Spaltung von α -Dicarbonylverbindungen in Säure und Aldehyd ist auch ein nucleophiler Angriff des eingesetztenamins an einer Ketofunktion denkbar:



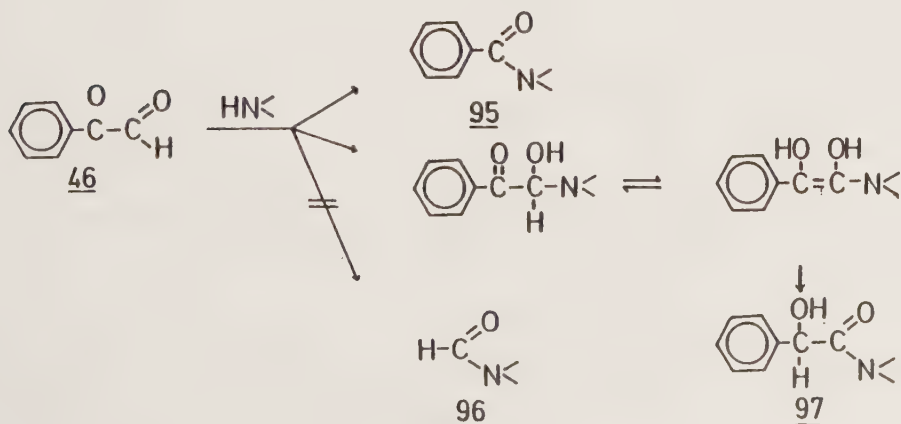
Drängt ein Elektronenpaar der OH-Gruppe und das freie Elektronenpaar des Stickstoffs im Halbaminal - unterstützt durch den Elektronenzug der zweiten Ketogruppe - das Bindungselektronenpaar aus der C-C-Bindung, so entstehen ein Säureamid und der zugehörige Aldehyd. Grundsätzlich sind wieder alle aus Zuckern entstehenden α -Dicarbonylverbindungen für diese Reaktion geeignet. Doch schon die Suche nach dem aus der 4-Desoxyhexosulose 3 zu erwartenden Glykolsäurepropylamid (93) in Glucose/Propylamin-Umsetzungsgemischen blieb erfolglos. Auch das Erythrönsäurepropylamid (94), das aus der 1-Desoxyhexosulose 1 entstehen könnte, war nicht zu finden.



Säureamide stellen stabile Substanzen dar, die beim Erhitzen unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion kaum mehr gespalten werden sollten. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die Säure-

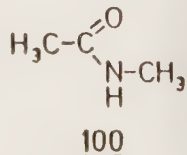
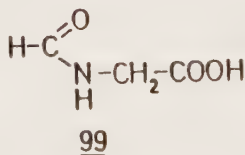
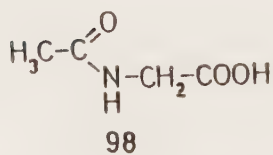
amid-Bildung eine eher untergeordnete Rolle bei der Maillard-Reaktion spielt.

Zur Untersuchung des Mechanismus setzten Hayase et al. Diacetyl und Glyoxal als Modell- α -Dicarbonylverbindungen mit N-Butylamin bei pH 6,7 um und erhielten die erwarteten Säureamide (90a) und (91a) (33). Über das Auftreten oder die Oxidationsstufe eines zweiten Bruchstücks machten die Autoren aber keine Aussage. Diacetyl und Glyoxal dienten als vereinfachte Modelle für die Desoxyhexosulosen 1 und 2. Darüberhinaus war aber Diacetyl als flüchtige Hauptkomponente durch Head-space-GC-Analyse in Glucose/Butylamin-Gemischen identifiziert worden (23). Hayashi und Namiki bewiesen die Entstehung von Glyoxal in einem frühen Stadium der Maillard-Reaktion (34). So können diese beiden Substanzen auch direkte Vorstufen der Säureamide 90 und 91 sein. Die Modellumsetzungen von Beck mit Phenylglyoxal und Propylamin bzw. Piperidin bei pH 7 ergaben jedoch nur die Bildung von Benzamiden 95, während die entsprechenden Formamide 96 auch nicht in Spuren entdeckt werden konnten (14).

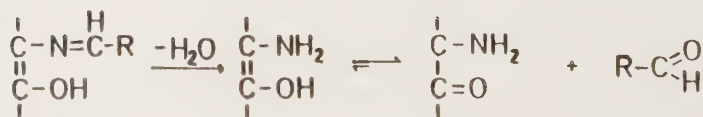


Das Auftreten der Mandelsäureamide 97 wies allerdings darauf hin, daß nach Amin-Addition eine Tautomerisierung zum Mandelsäurederivat gegenüber der C-C-Spaltung eindeutig bevorzugt ist.

Ein unklares Bild liefern auch die Umsetzungen mit Aminosäuren. Im mit Acetonitril/Essigester ausgeschüttelten Glucose/Glycin-Umsetzungsgemisch konnte ich weder das N-Acetyl- noch das N-Formylglycin (98) bzw. (99) finden. Nach vierstündigem Erhitzen eines Glucose/Glycin-Gemisches bei pH 6,7 entdeckten Hayase et al. geringe Mengen N-Acetylglycin (98) und dessen Decarboxylierungsprodukt 100 (33).



Auch unter diesen Bedingungen war kein N-Formylglycin (99) zu finden. Ein Grund, warum Säureamide von Aminosäuren in geringen Mengen gebildet werden, liegt sicher in der Konkurrenzreaktion des Strecker-Abbaus von Aminosäuren in Anwesenheit von α -Dicarbonylverbindungen. Bei dieser Reaktion entsteht nach Decarboxy-

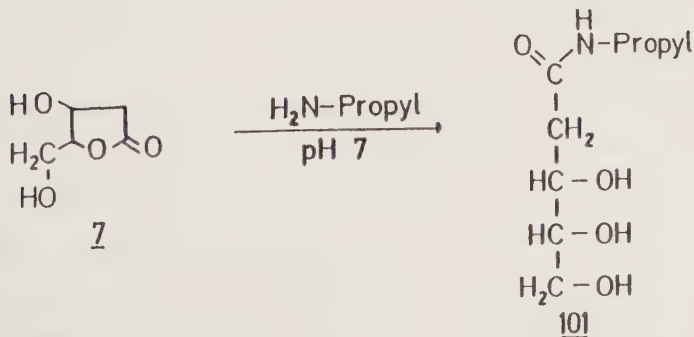


lierung der Aminosäure und hydrolytischer Spaltung des zwischenzeitlich gebildeten Azomethins eine α -Aminocarbonylverbindung und ein Aldehyd.

Diese Reaktion ist für α -Aminosäuren spezifisch.

Auch wird in Glucose/Glycin-Umsetzungsgemischen eine große Menge der Aminosäure in die unlöslichen, hochmolekularen Melanoidine eingebaut. Dort sind sie nach IR-Untersuchungen von Kim et al. v.a. in Form von Säureamiden gebunden (35).

Lactone und Ester können bei längerem Erhitzen mit Aminen in Säureamide übergeführt werden. Die stabileren Amide reichern sich im Verlauf der Reaktion an. Da während der Maillard-Reaktion z.T. große Mengen an Lactonen wie das 2-Desoxyribonolacton (7) und Ester wie 64 gebildet werden, untersuchte ich die Geschwindigkeit der Säureamidbildung aus derartigen Substanzen in verdünnter wäßriger Lösung. Ich erhitzte das Lacton 7 unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion bei pH 7 mit Propylamin und verfolgte die Entstehung des 2-Desoxyribonsäurepropylamids (101) gaschromatographisch.



Auch nach 4 Stunden hatte sich unter den von mir gewählten Bedingungen erst ca. 1/40 des eingesetzten Lactons zum Säureamid umgesetzt.

Die Entstehung der Säureamide aus Estern oder Lactonen dürfte daher bei der Maillard-Reaktion nur eine untergeordnete Rolle spielen.

4. Quantitative Betrachtungen

Nach einer qualitativen Identifizierung von Umwandlungsprodukten in Zucker/Amin-Umsetzungsgemischen versuchte ich, die Entstehung einzelner Substanzen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zu verfolgen.

Zuerst untersuchte ich die Möglichkeit, das Reaktionsgemisch nach Entfernung des Wassers direkt zu silylieren, um unverfälschte Meßwerte zu erhalten. Dies lieferte aber schlechte Ergebnisse, da ohne Vorfraktionierung sich das Material - das schon nach kurzer Erhitzungszeit auch polymere Melanoidine enthält - nicht vollständig in Pyridin lösen ließ. Auch die Zugabe von Aktivkohle schon beim Abrotieren des Wassers zur Oberflächenvergrößerung half nicht weiter.

Um reproduzierbare Werte zu erhalten, muß das Reaktionsgemisch unter standardisierten Bedingungen vorgetrennt werden. Nach dem Erhitzen von Glucose mit Butylamin in gepufferter, wäßriger Lösung extrahierten Hayase und Kato die mit Natriumchlorid gesättigte wäßrige Lösung mit Diethylether. Die quantitative Bestimmung der einzelnen Verbindungen erfolgte am Gaschromatographen mit internem Standard (33). Mit dieser Methode blieben sie na-

türlich auf die in Diethylether löslichen Substanzen beschränkt.

Zusätzlich tritt - wie auch beim Ausschütteln des Glucose/Glycin-Umsetzungsgemisches mit Acetonitril/Essigester - das Problem auf, daß einige Substanzen nicht vollständig extrahierbar sind. Untersucht man hier die wäßrige Reaktionslösung nach dem Ausschütteln, so findet man darin z.B. noch große Mengen an Milchsäure (18) und β -Hydroxypropionsäure (32).

Auch die gewählte Derivatisierungsmethode kann das Bild verzerren. So fand ich, daß z.B. nicht-umgesetztes Glycin nur langsam silyliert wird und daher im Gaschromatogramm je nach Reaktionszeit verschieden große Peaks liefert.

Ich stellte bei weitgehend standardisierten Aufarbeitungs- und Derivatisierungsbedingungen (Ausschütteln mit Acetonitril/Essigester, 1h Silylierungszeit) fest, daß sich in den ersten Stunden der Maillard-Reaktion die mengenmäßige Verteilung der Produkte im wesentlichen nicht verändert. Dies liegt zum einen daran, daß aus noch vorhandenem Zucker laufend Reaktionsprodukte nachgebildet werden. Auch nach 21stündigem Erhitzen ist Glucose noch in großen Mengen nachweisbar. Zum anderen werden viele Verbindungen durch ihren Einbau in die Melanoidine der Lösung wieder entzogen.

Lediglich für Milchsäure (18) und β -Hydroxypropionsäure (32) ist eine ständige Zunahme festzustellen. In Disaccharid/Amin-Umsetzungsgemischen findet man zusätzlich eine Anreicherung der Glykolsäure (33). Dies belegt die Entstehung von 33 aus der Dicarbonylverbindung 3, welche aus Disacchariden in wesentlich größeren Mengen gebildet wird als aus Monosacchariden.

Für exakte quantitative Untersuchungen gerade der polaren Mailard-Produkte müßten andere Methoden der Vorfraktionierung wie etwa die Gelfiltration oder HPLC-Trennungen mit unterschiedlichen Säulenmaterialien getestet und standardisiert werden.

C. Proteingebundene Zuckerumwandlungsprodukte

1. Auftreten proteingebundener Zuckerumwandlungsprodukte

Die Maillard-Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und Aminosäuren ist durch eine Vielzahl von Modellversuchen ausführlich durchleuchtet worden. Die Aminkomponente katalysiert dabei einen raschen und vielseitigen Zuckerabbau.

In Lebensmitteln ist jedoch die Konzentration an freien Aminosäuren i.a. gering. Sie kann durch enzymatische Proteinhydrolyse in Folge von Lagerung oder Bearbeitung nur allmählich ansteigen.

Daher sind es neben den N-terminalen Aminosäuren v.a. die ϵ -Aminogruppen des proteingebundenen Lysins, die als reaktive Aminkomponenten in die Maillard-Reaktion eintreten. Sie können nun einerseits katalytische Wirkung auf den Zuckerabbau ausüben, andererseits aber auch selbst irreversibel in ein Umwandlungsprodukt eingebaut werden.

1.1. Nachweis der katalytischen Wirkung des Proteins

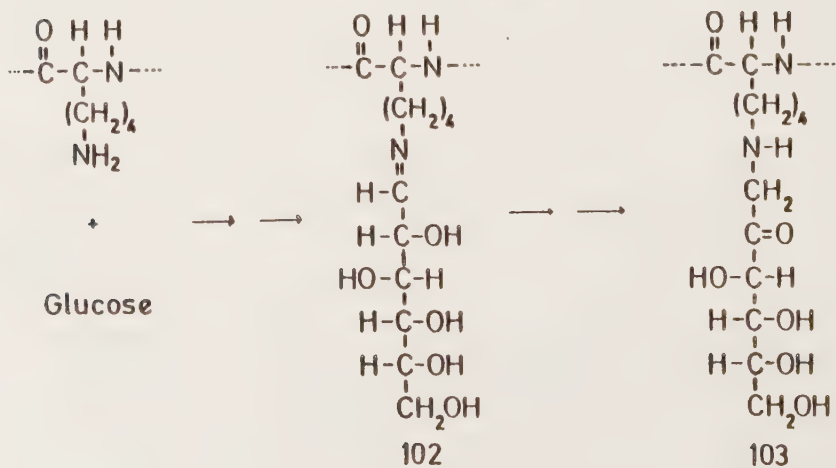
Die Entstehung typischer, N-freier Umwandlungsprodukte wie z.B. des Dihydropyranons 5 oder des Lactons 7, die aus Modellversuchen mit Aminen oder freien Aminosäuren bekannt sind, beweist den katalytischen Einfluß des Proteins beim Zuckerabbau. So konnte man Verbindung 5 als gaschromatographisch erfaßbares Hauptprodukt in verschiedenen Lebensmitteln nachweisen (15,16).

Ich setzte in Vorversuchen Rinderserumalbumin unter verschiedenen Bedingungen mit Glucose um. Nach Acetonfällung des Proteins konnte ich bei den bei pH 7 gepufferten Ansätzen u.a. Milchsäure (18), β -Hydroxypropionsäure (32) sowie das Dihydropyranon 5, bei pH 5 u.a. das 2-Desoxyribonolacton (7) finden.

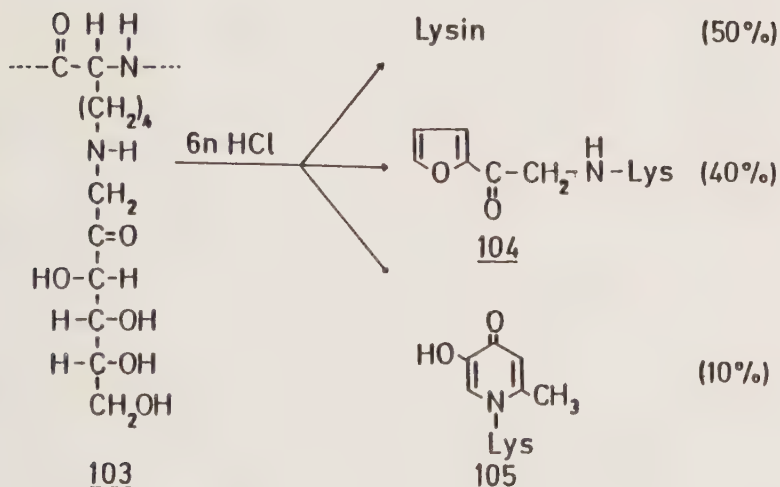
1.2. Bekannte proteingebundene Umwandlungsprodukte

Gerade unter dem Aspekt der sog. Lysinschädigung von Lebensmitteln sind Reaktionen der ϵ -Aminogruppe des Lysins von Interesse. Art und Ausmaß der Reaktionen am Lysin bestimmen die Verfügbarkeit dieser essentiellen Aminosäure im menschlichen Körper.

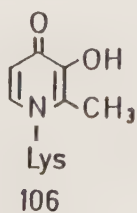
Bei der Reaktion der ϵ -Aminogruppe mit einem reduzierenden Zucker entsteht zunächst das instabile Halbaminal, das nach Wasserabspaltung in die Schiff'sche Base 102 übergeht. Durch Tautomerisierung entsteht im Zuge der sog. Amadori-Umlagerung das proteingebundene Fructose-Lysin (103).



103 kann über die bei der sauren Proteinhydrolyse entstehenden Kunstprodukte Furososin (ε-N-(2-Furoylmethyl)-L-Lysin) (104) und Pyridosin (ε-N-1,4-Dihydro-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-1-pyridyl-L-Lysin) (105) bestimmt werden (36).



Auftretende Unregelmäßigkeiten im ansonsten konstanten Verhältnis von Furososin zu Pyridosin können wahrscheinlich durch die Entstehung des zum Pyridosin isomeren Maltosins (106) erklärt werden (37). Maltosin stellt kein Kunstprodukt der Säurehydrolyse dar, sondern entsteht im Zuge der Maillard-Reaktion.

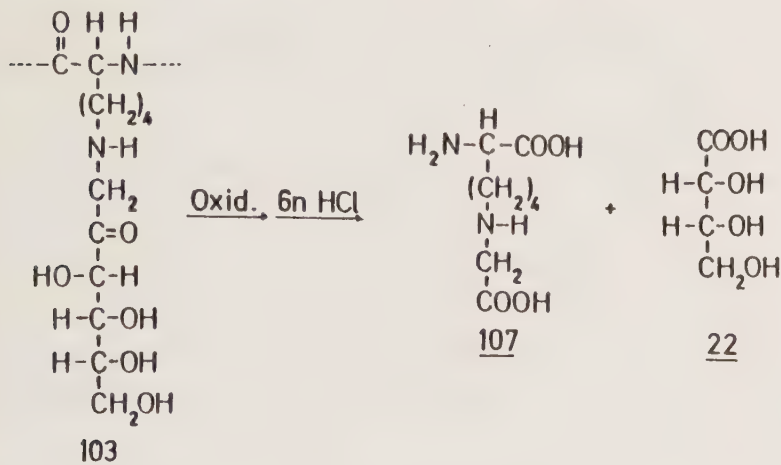


Fructose-Lysin (103) kann im Gegensatz zu seinen Vorstufen von Ratten in Fütterungsversuchen nicht mehr verwertet werden (38) und trägt so wesentlich zur Lysinschädigung von Proteinen bei. Furosin kann am Aminosäure-Analysator, gaschromatographisch nach Derivatisierung oder am HPLC bestimmt werden (39-43). In hitzebehandelten Lebensmitteln wurden bis zu 20g Furosin pro kg Produkt (bei walzengetrocknetem Kaffeeweißer) gefunden (44). Bei Milchpulver, das 9 Wochen bei 60°C gelagert wird, kann bis zu 40% des enthaltenen Lysins als Fructose-Lysin vorliegen (45).

In gleicher Weise wurde Fructose-Lysin (103) in Proteinen des menschlichen Körpers identifiziert, z.B. in Hämoglobin A, in Membranproteinen von Erythrozyten, in Humanserumalbumin, in Fingernägeln und in Augenlinsenprotein. In allen Untersuchungen wurden bei Diabetikern mit ihrem erhöhten Blutzuckerspiegel entsprechend erhöhte Furosin-Werte gemessen (46,47). Auch konnte gezeigt werden, daß nicht alle Lysin-Seitenketten der Proteinstränge gleichermaßen stark reagieren, sondern daß an einigen bestimmten Stellen das Amadoriprodukt bevorzugt gebildet wird (48,49).

Ein weiteres Umwandlungsprodukt des proteingebundenen Fructose-Lysins (103) ist das Carboxymethyllysin (107). Man vermutet, daß es durch eine oxidative Spaltung des Fructose-Lysins zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 der Zuckerkette entsteht. Für diese oxidative Spaltung ist offensichtlich die Anwesenheit von elementarem Sauerstoff notwendig. Baynes et al. postulieren einen metallkatalysierten, radikalischen Mechanismus (50). Ne-

ben Carboxymethyllysin (107) konnte Erythrönsäure (22) als Oxidationsprodukt nachgewiesen werden.

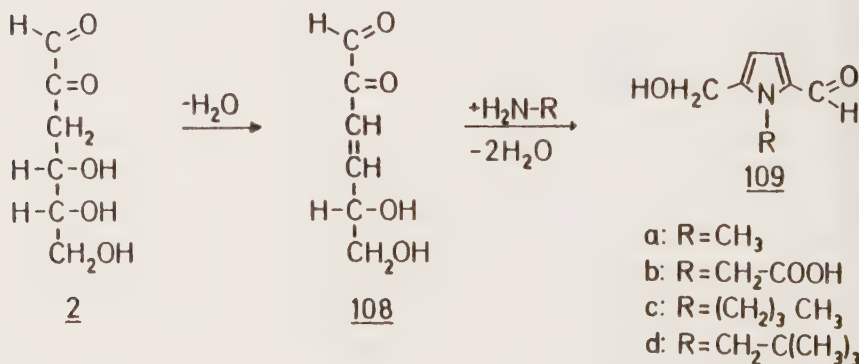


Carboxymethyllysin wurde z.B. in Hydrolysaten von menschlichem Augenlinsenprotein, aber auch im Urin gefunden. Es blieb aber ungeklärt, ob es mit der Nahrung aufgenommen oder erst im Körper gebildet worden war (51). Messungen von Carboxymethyllysin (107) im Urin von Ratten zeigen allerdings, daß ein deutlicher Zusammenhang mit der Art und der Qualität des verfütterten Proteins besteht (52). Das Carboxymethyllysin kann gaschromatographisch gut erfaßt werden (53).

Amadoriprodukte wie Fructose-Lysin (103) sind nun keineswegs Endprodukte der Maillard-Reaktion, sondern Zwischenprodukte zu Beginn eines aminkatalysierten Zuckerabbaus. Dieser führt über die Desoxyhexosulosen 1, 2 und 3 zu stabilen Endprodukten.

1.3. N-haltige Hauptprodukte der Maillard-Reaktion

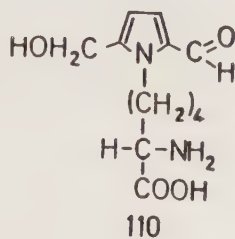
In Modellversuchen mit Aminen und verschiedenen Hexosen sowie Disacchariden konnte man jeweils als wichtiges N-haltiges Umwandlungsprodukt einen Hydroxymethylpyrrolaldehyd des Typs 109 nachweisen. Dabei entspricht R dem jeweiligen Rest des eingesetzten primären Amins bzw. der eingesetzten Aminosäure (s. Verbindungen 109a-c) (54-56). In die reaktive Zwischenstufe 2 wird nach Wasserabspaltung die Aminkomponente zwischen die Kohlenstoffatome 2 und 5 der Zwischenverbindung (108) eingebaut. Durch weitere Wasserabspaltung erfolgt die Aromatisierung zum Pyrrol 109.



Auch bei Umsetzung äquimolarer Mengen Glucose und Neopentylamin bei 37°C kann man das entsprechende Pyrrollderivat 109d als Hauptprodukt finden (57).

Aus der Struktur des Pyrrols 109 geht hervor, daß die ε-Aminogruppe des Lysins ebenfalls in dieser Weise reagieren kann.

Ich versuchte daher, die Entstehung von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-1-norleucin (110) am Protein nachzuweisen.



1.4. Synthese von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-1-norleucin (110)

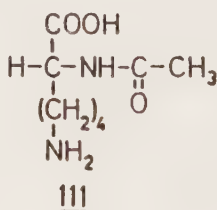
2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-1-norleucin wurde erstmals von Nakayama et al. aus Glucose/Lysin-Umsetzungsgemischen isoliert und identifiziert (58). Kurz darauf gelang dies auch Olsson et al. (59). Die Isolierung des Norleucyl-Pyrrols 110 aus erhitzten Hexose/Lysin-Gemischen erfordert aber eine langwierige Reinigung.

Eine Totalsynthese von 110 in sieben Teilschritten wurde 1985 von Miller und Olsson vorgestellt (60). Zur Herstellung einer Vergleichssubstanz erschien mir auch dieses Verfahren als zu aufwendig.

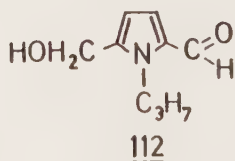
Eine direkte Überführung von Hydroxymethylfurfural (9) in das entsprechende Pyrrolderivat ist nur unter sehr drastischen Bedingungen möglich. Jurch und Tatum fanden bei der Umsetzung von 9 mit Methyamin bei 140°C in wäßrig-methanolischer Lösung nach 24h gerade 1,7% Pyrrolderivat (54). Eigene Versuche ergaben,

daß mit N^ω-Acetyllysin (111) als Aminkomponente die Ausbeuten noch niedriger lagen.

Ich wählte daher zur Herstellung von 110 die Umsetzung von N^ω-Acetyllysin (111) mit Glucose. Die α-Acetylschutzgruppe ermöglichte eine gezielte Umsetzung der ε-Aminogruppe und reduzierte gleichzeitig die Produktvielfalt, was die chromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches vereinfachte.



Zu diesem Zweck wurden zunächst in Modellumsetzungen von Glucose mit Propylamin die günstigsten Bedingungen für die Bildung von N-Propyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-2-aldehyd (112) ermittelt.



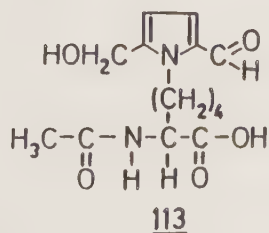
Die jeweils entstandene Menge an 112 läßt sich gaschromatographisch bestimmen. Das Verhältnis von 112 zum N-freien Hauptprodukt 5 spiegelt das Ausmaß des Amin-Einbaus in die Zuckerkette wider (s. Tab.1).

Tabelle 1. Quantitative Bestimmung von 112 und 5 in Glucose/
Propylamin-Umsetzungsgemischen

Verhältnis Glc/Amin, Vers.bed.	Verb <u>5</u>	Verb <u>112</u>
	(rel.Mengen)	
1 : 2, H ₂ O, pH 6, 2h	1	0,3
1 : 2, H ₂ O, pH 5, 2h	1	1,0
1 : 2, H ₂ O, pH 4, 2h	1	7,1
1 : 4, H ₂ O, pH 5, 2h	1	2,6
1 : 2, in EtOH+Eisessig, 2h	1	9,8
1 : 1, H ₂ O, pH 5, 2h	1	1,7
1 : 2, H ₂ O, pH 5, 6h	1	6,0
1 : 2, H ₂ O, pH 5, 15h	1	40,1
1 : 1, H ₂ O, pH 5, 2h autoklaviert	1	2,6

Daraus ergibt sich, daß bei einem deutlichen Überschuß an Amin bei pH 5 in ethanolischer Lösung und langer Reaktionsdauer die höchsten Ausbeuten an N-Propyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-2-aldehyd (112) zu erwarten sind.

N^α-Acetyllysin und Glucose sind sehr schlecht, das gewünschte Umwandlungsprodukt 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-1-N-acetyl-norleucin (113) dagegen ist sehr gut in Ethanol löslich.



Sie sind somit durch eine einfache Filtration voneinander abzutrennen. Eine zweifache Säulentrennung an Kieselgel führt zu einem gelb-braunen Rohprodukt. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte, das das Pyrrolderivat 113 in großer Reinheit vorlag.

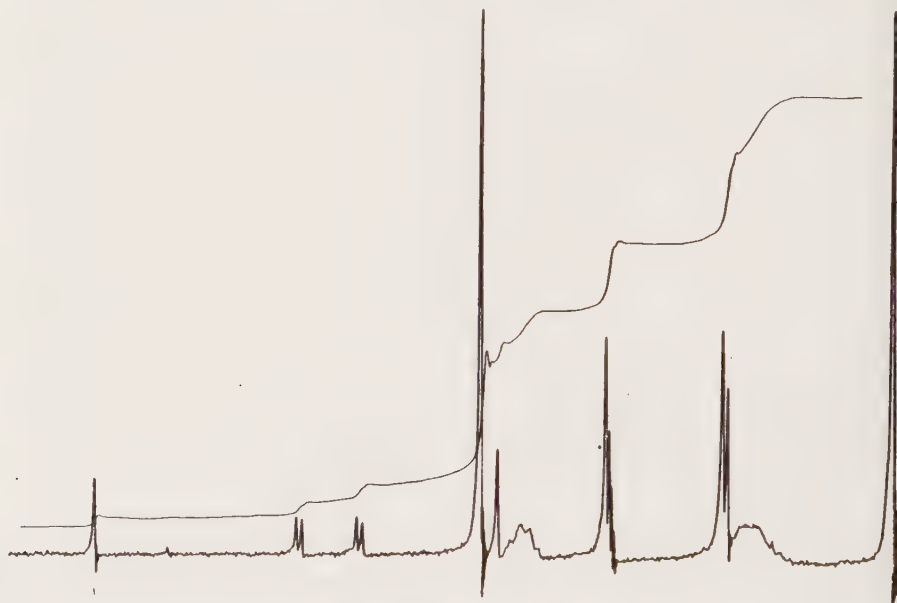


Abb. 5: ^1H -NMR-Spektrum (60 MHz) von 113

Die Abspaltung der α -Acetylschutzgruppe von der vorgereinigten Substanz 113 kann basenhydrolytisch oder enzymatisch erfolgen. Letztere Methode ist einer Basenhydrolyse vorzuziehen, da dort nach Neutralisation eine große Menge Salz vom Produkt abgetrennt werden muß. Nach zwei weiteren Reinigungsschritten am HPLC an einer semipräparativen RP-18-Säule konnte ich 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-1-norleucin (110) in sehr großer Reinheit gewinnen.

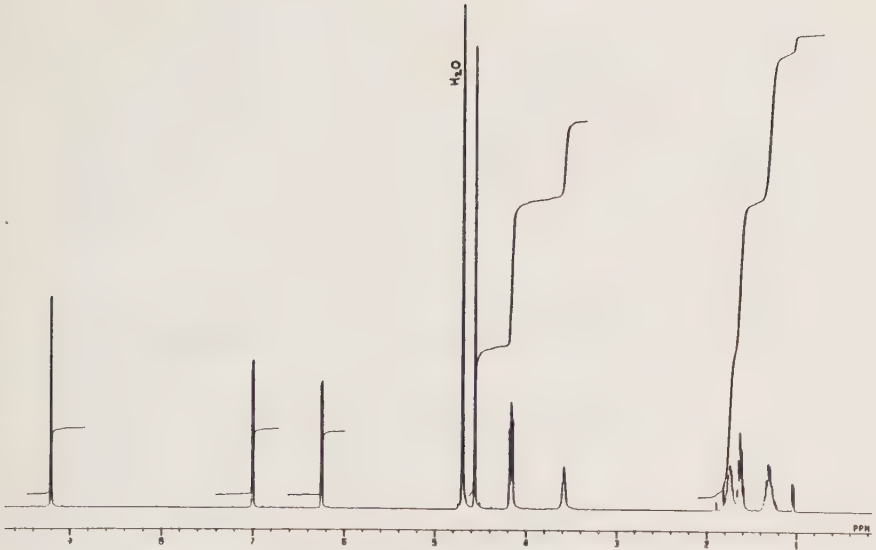


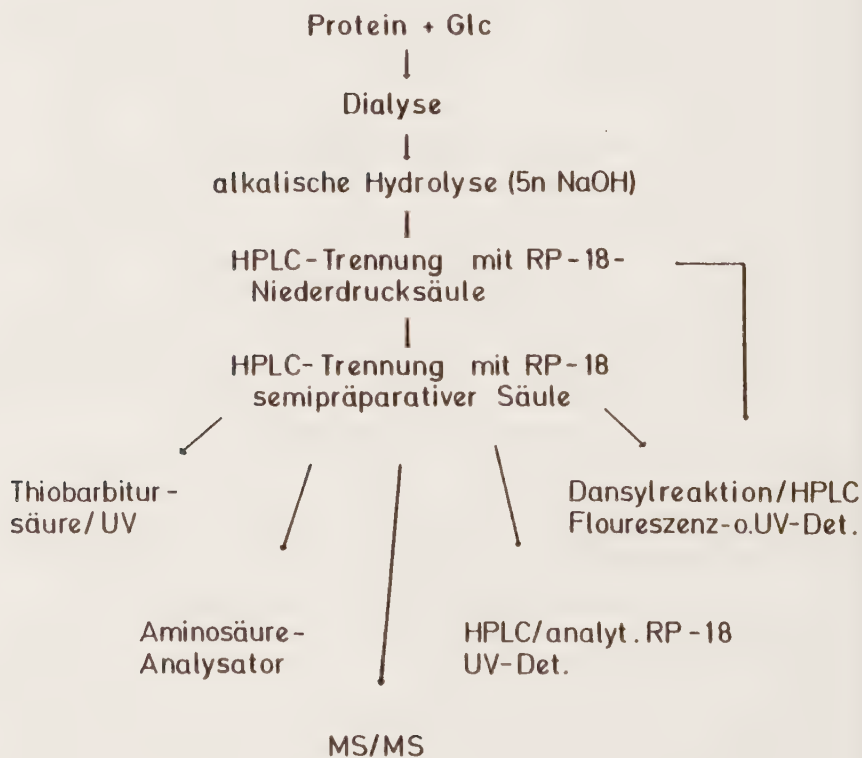
Abb.6: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von 110 nach HPLC-Reinigung

2. Nachweis der Bildung von 110 beim Erhitzen von Rinderserumalbumin (RSA) mit Glucose (s.a. Schema 5)

2.1. Proteinumsetzungen, Hydrolyse und Vorfraktionierung

RSA stellt ein für die Umsetzung mit Zuckern geeignetes Protein dar, da es ca. 10% der Aminosäuren als Lysin enthält (61). Damit ist es im Lysingehalt mit Casein vergleichbar (62). Außerdem läßt es sich bei pH 5-7 gut in gepufferte wäßrige Lösung bringen.

Ich setzte RSA bei pH 7 und 50°C 3 Wochen sowie bei pH 5 und 37°C 4 Wochen mit Glucose um. Die hellbraun gefärbten Lösungen wurden 2-3 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend mit 5N NaOH hydrolysiert (63). Eine Hydrolyse mit

SCHEMA 5

Bariumhydroxid wurde vermieden, da nach einer Neutralisation mit Schwefelsäure viele Aminosäuren am Bariumsulfat-Präzipitat in nicht reproduzierbaren Mengen adsorbiert werden können (64). Eine saure Proteinhydrolyse ist nicht möglich, da unter diesen Bedingungen der Pyrrolring von Verbindung 110 zerstört werden würde.

Nach Neutralisation wird die Aminosäuren-Lösung an einer RP-18-Niederdrucksäule am HPLC vorgetrennt. Zusammen mit Tryptophan wird 110 an RP-18-Material stark zurückgehalten. Die nahezu quantitative Abtrennung des Tryptophans gelang mit einer semi-präparativen RP-18-Säule.

Die Verwendung von Triethylammoniumformiat als Puffersalz im Elutionsmittel ermöglicht im Gegensatz zu Phosphatsalzen die rückstandsfreie Gewinnung von 110 aus dem Eluat, da Triethylammoniumformiat weitgehend am Hochvakuum entfernt werden kann.

2.2. Nachweisverfahren für 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-1-norleucin (110)

2.2.1. Aminosäure-Analyse

An einem LKB-4400-Aminosäure-Analysator mit nachgeschalteter Ninhydrinreaktion und UV-Detektion bei 570nm eluiert Verbindung 110 genau auf Höhe des Phenylalanins. Dies erklärt, warum 110 bis heute bei standardisierten Aminosäure-Untersuchungen basen-hydrolysierter Proteine nicht entdeckt werden konnte. Phenylalanin selbst wird bei der Vorfraktionierung des hydrolysierten Proteins an RP-18-Material (s.o.) vollständig abge-

trennt und kann die Analyse an dieser Stelle dann nicht mehr stören.

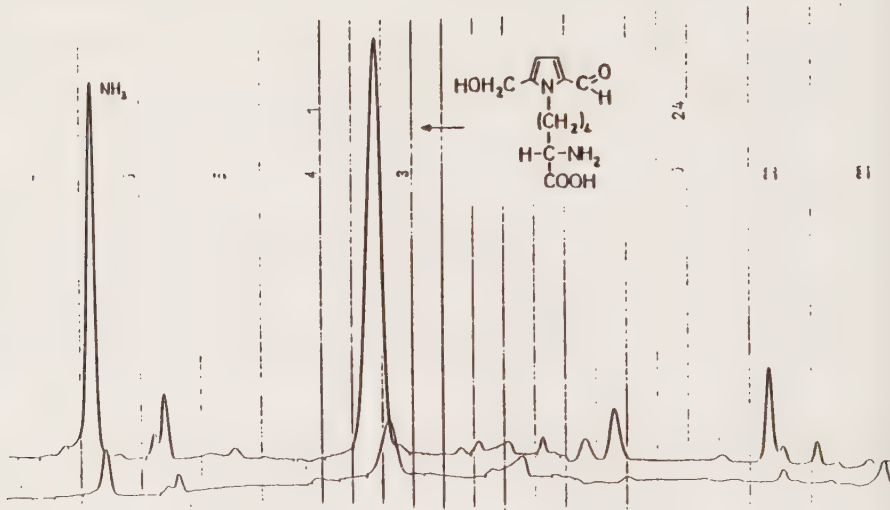


Abb.7: Aminosäuren-Chromatogramm des vorfraktionierten Proteinhydrolysats

2.2.2. HPLC/UV

Eine direkte Bestimmung von 110 ist an einer analytischen RP-

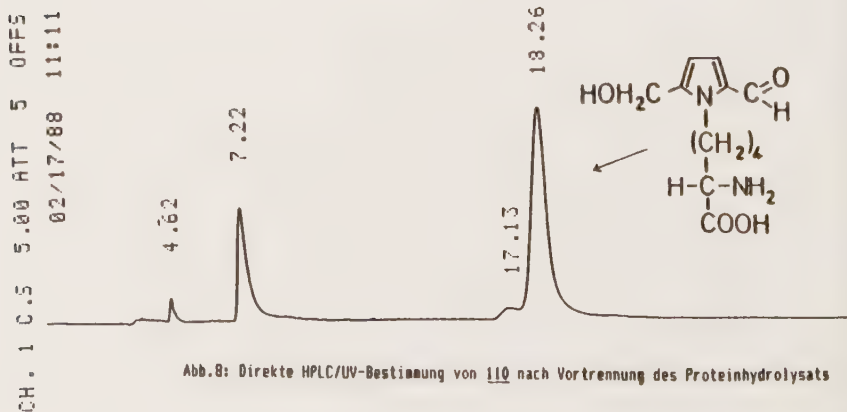
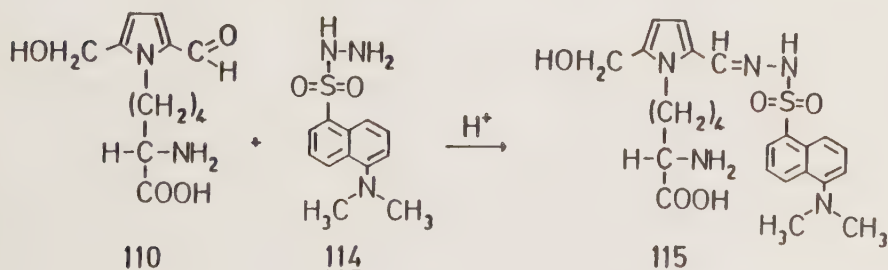


Abb.8: Direkte HPLC/UV-Bestimmung von 110 nach Vortrennung des Proteinhydrolysats

18-Säule mit UV-Detektion bei 296nm möglich. Die große Retentionszeit unter den gewählten Bedingungen garantiert eine gute Abtrennung von Verunreinigungen. Zudem ist es möglich, die Reinheit des Substanz-Peaks mit einem Diodenarray-Detektor bei jeder Analyse in Hinblick auf UV-absorbierende Verunreinigungen zu überprüfen.

2.2.3. HPLC/Floureszenzdetektion

Mopper und Johnson (65) optimierten eine von Alpenfels 1981 vorgestellte HPLC-Methode (66) zur Bestimmung dansylierter Zucker. Die Umsetzung mit Dansylhydrazin (5-Dimethylaminonaphthyl-1-sulfonyl-hydrazin) (114) erfolgt im wäßrigen Medium rasch und unter milden Bedingungen. Die zur Katalyse der Reaktion eingesetzte Menge an Trichloressigsäure reicht noch nicht aus, den säureempfindlichen Pyrrolring von 110 anzugreifen. Daher ließ sich diese Methode auf Verbindung 110 übertragen.



Modellversuche mit N-Propyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-2-aldehyd (112) ergaben eine quantitative Umsetzung zum Dansylderivat. Die HPLC-Bestimmung muß allerdings sofort nach der Derivatisie-

rung erfolgen, da die Dansylhydrazone nur für kurze Zeit stabil sind. Der Versuch, ein solches Dansylhydrazone schichtchromatographisch abzutrennen und dessen Struktur mit Hilfe eines ^1H -NMR-Spektrums zu bestätigen, schlug daher fehl.

Die Abtrennung des Dansylderivats 115 vom im 20fachen Überschuß eingesetzten Derivatisierungsreagenz gelingt mit der Wahl eines geeigneten Fließmittels. Trotzdem tauchen im Bereich des Derivats im Fluoreszenz-Chromatogramm unspezifische Störpeaks auf.

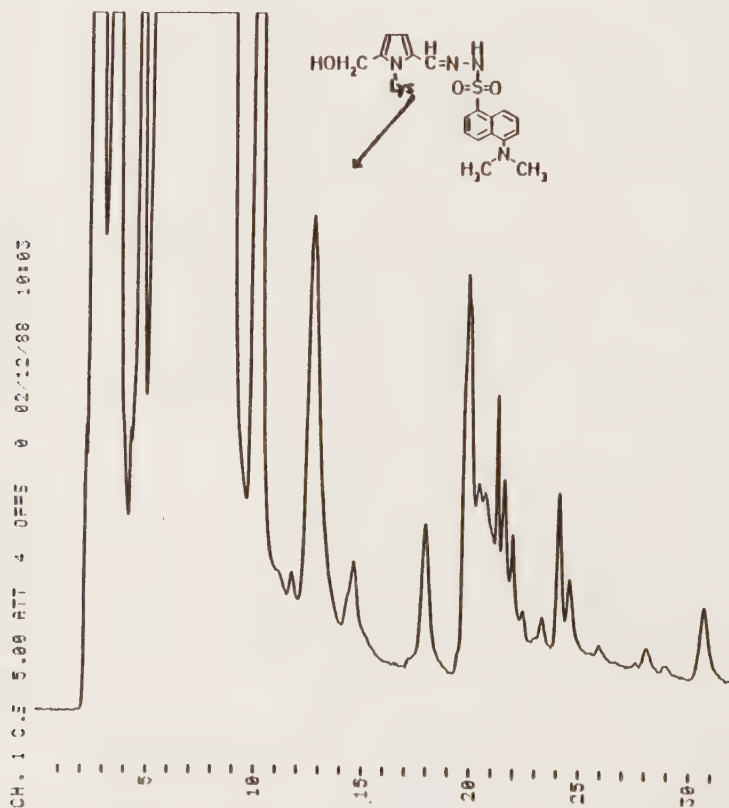
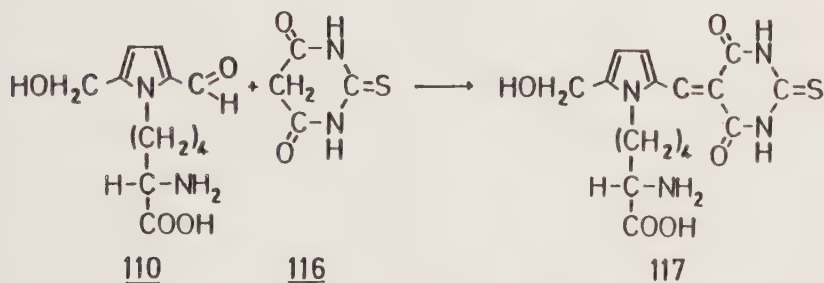


Abb.9: HPLC-Bestimmung von 110 mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors nach Vortrennung des Proteinhydrolysa

Die angestrebte höhere Nachweisempfindlichkeit gegenüber der UV-Detektion ($\lambda = 300\text{nm}$) konnte daher nicht erreicht werden. Durch die Spezifität der Fluoreszenzmessung kann diese Methode allerdings auch bei weniger vorgereinigten Proben verwendet werden.

2.2.4. Colorimetrie

110 setzt sich in wäßriger, phosphorsaurer Lösung bei 75°C mit Thioarbitursäure (116) zum gelben Kondensationsprodukt (117) um (67,68).



Die photometrische Messung bei 455 nm kann zur quantitativen Bestimmung genutzt werden. Die Reproduzierbarkeit der Methode und ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Extinktion ließen sich verifizieren. Da unter den gewählten Reaktionsbedingungen aber viele Carbonylverbindungen positiv reagieren und kein weiterer Trennschritt nach der Derivatisierung zur Anwendung kommt, muß die Vortrennung überprüft werden. Dies geschieht am besten dünnschichtchromatographisch mit verschiedenen Fließmitteln und Besprühen mit Dinitrophenylhydrazin.

Eine direkte photometrische Bestimmung des proteingebundenen Pyrrolderivats 110 ohne vorherige Hydrolyse des Proteins ist nicht möglich, da das Protein beim Erhitzen in der zur Derivatisierung verwendeten sauren Lösung denaturiert wird.

2.2.5. MS/MS

Im FAB-pos-Massenspektrum erhält man für Verbindung 110 ein Signal bei 255 Masseneinheiten ($M^+ + 1$). Diese Masse kann gezielt abgelenkt und einer zweiten massenspektrometrischen Untersuchung nach Elektronenstoßionisation unterworfen werden. Man erhält dann ein für 110 charakteristisches Massenspektrum, das sich allerdings nicht wie ein gewöhnliches EI-Spektrum interpretieren läßt.

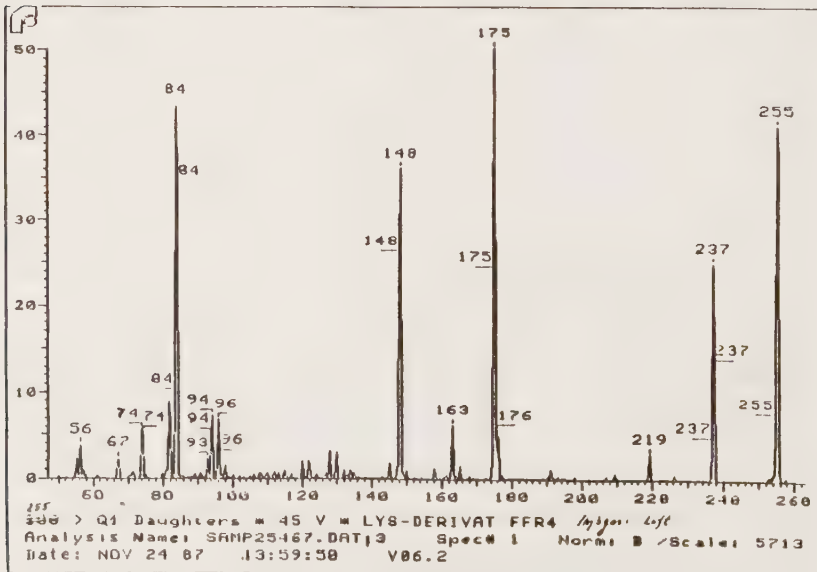


Abb.10: MS/MS-Spektrum von Verbindung 110

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, die Anwesenheit von 110 auch in einem Substanzgemisch (z.B. nach der ersten Vorfraktionierung des Proteinhydrolysats) selbst in kleinsten Mengen eindeutig nachzuweisen. Eine quantitative Aussage kann damit aber nicht getroffen werden.

2.2.6. Gaschromatographie

Zur Derivatisierung von Aminosäuren für die Gaschromatographie sind verschiedene Methoden vorgeschlagen worden (69). Jedoch lieferte keines dieser Verfahren für das Norleucinderivat 110 brauchbare Ergebnisse.

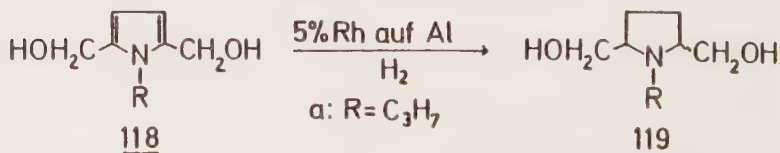
Die üblicherweise verwendete saure Veresterung der Carboxylgruppe führt zu einer Zerstörung der Pyrrolstruktur. Bei einer Veresterung mit Diazomethan gibt es deutliche Nebenreaktionen mit der Aldehydgruppe. Eine Veresterung mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid ist nur für an der α -Aminogruppe geschützte Aminosäuren möglich (70). Eine N-Acylierung von freien Aminosäuren führt aber zu störenden Nebenprodukten wie z.B. Azlactonen.

Eine Silylierung mit verschiedenen Silylierungsmitteln bis hin zum sehr reaktiven Bistrimethylsilyltrifluoracetamid unter drastischen Bedingungen führte zu keinem gaschromatographisch bestimmbaren Derivat.

2.2.7. Katalytische Reduktion des proteingebundenen Pyrrols 110 zur Herstellung eines säurestabilen Derivats

Der Nachweis des Pyrrolaldehyds 110 nach saurer Proteinhydrolyse ist nicht möglich, da das Pyrrol unter diesen Bedingungen zerstört wird. Es ist bekannt, daß Pyrrolidine säurestabil sind. Ich versuchte daher zunächst, den N-Propyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-2-aldehyd 112 unter schonenden Bedingungen zum Pyrrolidin zu reduzieren. Bei Verwendung von Rhodium als Hydrierungskatalysator bei Raumtemperatur und unter Normaldruck (71,72) sind Pyrrol-2-aldehyde aber zu desaktiviert, um reduziert werden zu können.

Daher reduzierte ich den Pyrrolaldehyd 112 mit NaBH_4 zum N-Propyl-2,5-di(hydroxymethyl)-pyrrol (118a). 118a ließ sich unter den oben erwähnten milden Bedingungen zum entsprechenden Pyrrolidin 119a reduzieren.



Nach Zusatz einer den Mengenverhältnissen im Protein angepaßten Menge Cystein zum Reduktionsansatz blieb die Reduktion jedoch aus. Wahrscheinlich hat die Thiolgruppe des Cysteins den Katalysator vergiftet. Daher ist diese Reduktionsmethode auf das proteingebundene Norleucylderivat 110 nicht anwendbar.

2.3. Ergebnisse und Diskussion

Mit den vorgestellten Methoden konnte ich die Bildung des proteingebundenen Produkts 110 bei der Umsetzung von Rinderserumalbumin mit Glucose unter milden Bedingungen nachweisen. Damit wurde erstmals ein proteingebundenes Produkt aus der Spätphase der Maillard-Reaktion identifiziert.

Eine halbquantitative Auswertung der Versuche ergab, daß sich beim Ansatz bei 50°C ca. jedes 1000ste, bei 37°C mehr als jedes 10 000ste Lysin bis zum Hydroxymethylpyrrolaldehyd umgesetzt hatte.

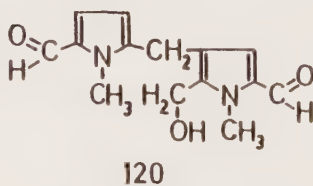
Damit befand sich die Konzentration von 110 deutlich oberhalb der Nachweisgrenze. Diese liegt für die direkte HPLC/UV-Bestimmung bei rund 5 ppb, für die Fluoreszenzmessung um den Faktor 10 unempfindlicher. Im Aminosäure-Analysator kann man ca. 4nmol Aminosäure pro Injektion nachweisen.

Die Nachweismethode kann nun auch auf hitzebehandelte Lebensmittel angewendet werden. Die Hydroxymethylpyrrolaldehyd-Struktur ist in einem pH-Bereich von 5-14 und bei starker thermischer Belastung stabil. Pyrrolaldehyde sind als vinyloge Säureamide gut mesomeriestabilisiert. U.U. läßt sich Verbindung 110 als Indikatorsubstanz für das Ausmaß einer Hitzebehandlung von Eiweiß in kohlenhydrathaltigen Lebensmitteln verwenden.

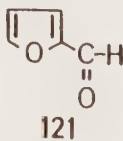
Die Bedeutung von Verbindung 110 für die Maillard-Reaktion in vivo muß noch geklärt werden. Über die Aldehydfunktion könnte sie eventuell an einer irreversiblen Vernetzung zweier oder mehrerer Proteinstränge beteiligt sein. Jedoch ist es bis heute

nicht gelungen, ein Vernetzungsprodukt nach Proteinhydrolyse zu identifizieren.

Olsson et al. fanden nach 24stündigem Erhitzen von Glucose und Methylamin bei pH 4,5 das Reaktionsprodukt zweier Hydroxymethylpyrrolaldehyde 120 (73). Die sauren Reaktionsbedingungen hatten die Abspaltung einer OH-Gruppe und damit den elektrophilen Angriff am zweiten Pyrrol begünstigt.



Um zu prüfen, ob diese Reaktion auch bei kurzen Erhitzungszeiten und neutralem pH ablaufen kann, erhitze ich N-Propyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-2-aldehyd (112) allein sowie in Anwesenheit von Furfural (121) unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion.



Es ließen sich unter den von mir gewählten Bedingungen aber keine Reaktionsprodukte nachweisen.

Zum Nachweis von Proteinverknüpfungen wäre eine enzymatische Totalhydrolyse größerer Proteinmengen von Nutzen. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

1986 teilten Öste et al. mit, daß die niedermolekulare Fraktion von Glucose/Lysin-Umsetzungen verschiedene Verdauungsenzyme deutlich hemmt (74). Daraufhin testeten sie diese Enzyme mit reinen Verbindungen, die in größerer Menge aus Glucose und Lysin gebildet werden (75). Dabei stellte sich heraus, daß Verbindung 110 u.a. die Wirkung von Amino-peptidase N durch kompetitive Hemmung deutlich beeinträchtigt. Beim Verfüttern von proteingebundenem und freiem Lysin an Ratten unter Zugabe von 110 erniedrigte sich der Lysingehalt im Blutplasma. Dies konnte mit Hilfe einer radioaktiven Markierung des verfütterten Lysins nachgewiesen werden. Sowohl die Proteinhydrolyse als auch die Resorption von freiem Lysin war im tierischen Organismus beeinträchtigt. Ob diese Wirkungen im menschlichen Körper eine Rolle spielen und inwieweit dort Substanz 110 beteiligt sein kann, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

C. Zusammenfassung

Das Erhitzen von Zuckern mit Aminen führt zu einer Vielzahl verschiedenartiger Produkte. Bei der Zubereitung und Lagerung von Lebensmitteln entstehen dabei sowohl erwünschte Substanzen wie Farb- oder Aromastoffe als auch unerwünschte, weil toxikologisch nicht unbedenkliche Verbindungen.

Mit Hilfe der GC/MS-Kopplung hat man die unpolaren, flüchtigen Produkte der Maillard-Reaktion vieler Zucker/Amin-Modellgemische und auch von Lebensmitteln gründlich analysieren können. Daher war es Ziel dieser Arbeit, aus einem Umsetzungsgemisch von Glucose mit Glycin die polaren niedermolekularen Umwandlungsprodukte zu isolieren und zu identifizieren. Dies gelang durch Extraktion der wäßrigen Lösung mit einem polaren Lösungsmittelgemisch.

Die polaren Substanzen mußten vor der GC/MS-Untersuchung derivatisiert werden. Dafür erwies sich die Silylierung als gut geeignet.

Auf diese Weise konnte ich Säuren, Ester, Lactone und Säureamide identifizieren, die z.T. noch nicht als Produkte der Maillard-Reaktion beschrieben waren.

Die Bildung vieler Produkte läßt sich aus reaktiven α -Dicarbonylverbindungen erklären, die nach Wasserabspaltung aus dem jeweiligen Zucker in der Frühphase der Maillard-Reaktion entstehen. Dabei ist eine Spaltung der α -Dicarbonylverbindungen in Säure und Aldehyd wahrscheinlicher als eine oxidative Spaltung in zwei Säuren. Einige Produkte können durch eine Spaltung von 1,3-Dicarbonylverbindungen gebildet werden.

Analog ist die Entstehung der Säureamide denkbar, die aber bei der Maillard-Reaktion mit Aminosäuren - außer bei sehr langen Erhitzungszeiten - nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Eine quantitative Analyse der Bildung polarer Substanzen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit erwies sich als schwierig, da diese zuerst von den polymeren Melanoidinen und vom nicht-umgesetzten Zucker abgetrennt und derivatisiert werden müssen. Auf jeden Fall reichern sich niedermolekulare Carbonsäuren im Verlauf der Reaktion an.

Die Maillard-Reaktion in vivo gewinnt gerade aus medizinischer Sicht immer größere Bedeutung. Man weiß seit einiger Zeit, daß Reaktionen der Frühphase der Maillard-Reaktion im menschlichen Körper ablaufen. An mehreren Körperproteinen - v.a. solchen mit hohen biologischen Halbwertszeiten - hat man Veränderungen eindeutig nachweisen können. Dies betrifft insbesondere die Diabetiker mit ihrem erhöhten Blutzuckerspiegel. Auch der Alterungsprozeß im menschlichen Körper wird in letzter Zeit u.a. mit der Maillard-Reaktion in Verbindung gebracht.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit gelang es, ein an der Lysin-Seitenkette proteingebundenes Zuckerumwandlungsprodukt aus einer späteren Phase der Maillard-Reaktion nachzuweisen. Das 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)pyrrol-1-norleucin hatte sich unter sehr milden Reaktionsbedingungen am mit Glucose umgesetzten Rinderserumalbumin gebildet. Es wurde ein allgemein anwendbarer Analysengang für diese Verbindung entwickelt.

Eine Verwendbarkeit dieser Substanz als Indikator für das Ausmaß einer Hitzebehandlung sowie ihr Auftreten in Lebensmitteln

und Körperproteinen müssen noch überprüft werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Allgemeine Angaben

1. Schichtchromatographie

DC-Alufolien beschichtet mit Kieselgel 60F₂₅₄, Schichtdicke 0,2mm (Merck)

PSC-Fertigplatten beschichtet mit Kieselgel 60F₂₅₄, Schichtdicke 0,5mm (Merck)

PSC-Fertigplatten beschichtet mit Kieselgel 60F₂₅₄, Schichtdicke 2mm (Merck)

2. Säulenchromatographie

Kieselgel, Silica-Woelm TSC Aktivität III

3. Niederdrucksäulenchromatographie

Merck Fertigsäulen "Lobar" Größe B

Trennmaterial: Lichroprep RP 18 (40-63µm)

Geräte:

- Pumpe: Waters 6000A
- UV-Detektor mit variabler Wellenlänge: Waters Modell 450

4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Semipräparative Stahlsäule: RP 18, 7µm, 250x10mm (Merck 50994)

Analytische Stahlsäule: RP 18, 5µm, 250x4,6mm (Bischoff 25461)

Geräte:

- Pumpe: Merck-Hitachi L-6000 P
- UV-Detektor mit variabler Wellenlänge: Merck-Hitachi L-4000
- Fluoreszenzdetektor: Merck-Hitachi F-1000
- Schreiber: Merck-Hitachi D2000 Chromato-Integrator

Alle HPLC-Froben wurden durch einen 45µm-Filter filtriert
(Millex HV H7H8235, Fa. Millipore)

5. Gaschromatographie

Apparat:

Perkin-Elmer 8320 Capillary Gas Chromatograph, FID ,
Splitverhältnis 1:10

Säulen:

- 25m Permaphase DMS 0,3µm, ID 0,25µm
- 25m Permaphase CFMS/1701 0,3µm, ID 0,25µm

Standardbedingungen:

Temp1: 100°C

Temp2: 260°C

Ramp Rate: 6°/min

Iso Time1: 0min

Iso Time2: 15min

Injektortemp: 260°C

Detektortemp: 260°C

Gasvordruck: 14,5psi

6. GC-MS-Kopplung

Kapillargaschromatograph: Carlo Erba 2110, gekoppelt mit
Massenspektrometer Varian MAT CH7 A (70eV)

7. Massenspektrometer

Varian MAT CH7 Mass-Spectrometer (70eV, Ionenquelle 230°C)

8. FAB-Massenspektrometrie bzw. MS-MS-Kopplung

HS Ø 30 mit Datensystem SS300, Finnigan/MAT Bremen
FAB Stoßgas Argon (8kV, 400µA)

9. IR-Spektroskopie

Perkin-Elmer 257 Grating Infrared Spectrophotometer

"KBr" entspricht dem Verreiben der Festsubstanz mit KBr und
Anfertigung eines Preßlings

"NaCl" entspricht der Messung einer flüssigen Substanz zwischen
zwei NaCl-Fenstern

10. UV-Spektroskopie

Beckmann Spektrophotometer 25

11. ¹H-NMR-Spektroskopie

- Varian T 60 (60 MHz)
- Jeol GX 400 (400MHz)

Messungen mit TMS als innerem Standard ($\delta=0,00$ ppm)

12. Aminosäure-Analyse

- Aminosäure-Analysator LKB 4400
- Stahlsäule 4x295mm gefüllt mit Ultro Pac-8
- Temperatur: $T_1=45^\circ\text{C}$, $T_2=56^\circ\text{C}$, $T_3=73^\circ\text{C}$
- Puffer: Na-Citrat-Puffer, 0,2mol/l, $P_1=\text{pH } 3,20$, $P_2=\text{pH } 4,25$
 $P_3=\text{pH } 6,45$ (+0,1mol/l NaCl)
- Detektion: Ninhydrinanfärbung und Messung im Durchfluß-
photometer bei 440 und 570nm
- Probenaufgabe: Substanz gelöst in Citratpuffer pH=2,2

13. Extraktionen

Verwendet wurden kontinuierliche flüssig/flüssig-Extraktoren

II. Spezielle Arbeitsmethoden

1. Silylierung (allgemeine Arbeitsvorschrift)

5-15mg Substanz in 0,5ml wasserfreiem Pyridin lösen und dazu 0,2ml Hexamethyldisilazan und 0,1ml Trimethylchlorsilan geben. Nach 1h stehen bei Raumtemperatur die Probe zentrifugieren und 0,3-0,5µl der überstehenden klaren Lösung am GC einspritzen.

2. Zucker/Glycin-Umsetzungsgemische

9,9g Glucose-Monohydrat bzw. 17,1g Lactose oder Maltose (0,05mol) und 3,75g Glycin (0,05mol) in Pufferlösung pH7 - bestehend aus ca. 3g K_2HPO_4 und 0,5g KH_2PO_4 in 25ml Wasser - lösen, 45min am Rückfluß erhitzen und dreimal mit insgesamt 200ml Acetonitril/Essigester (1:1, v/v) ausschütteln. Das Lösungsmittel unter reduziertem Druck weitgehend entfernen, den Rückstand silylieren oder weiter auftrennen.

3. Synthese und analytische Daten der Vergleichssubstanzen

Alle Vergleichssubstanzen wurden nach Silylierung gaschromatographisch erfaßt und in fast allen Fällen über ihre Massenspektren identifiziert. Aus Zucker/Amin-Umsetzungen isolierte Substanzen bzw. Substanzgemische konnten daraufhin über die Massenspektren und die Retentionszeiten am GC z.T. auf zwei Säulen zugeordnet werden.

(Die im folgenden angegebenen GC-Retentionszeiten R_t beziehen sich auf die DMS-Kapillarsäule)

3.1. Lactone

3.1.1. 2-Desoxyribonolacton (Z)

Die Herstellung erfolgte durch Oxidation der entsprechenden Aldose:

0,01mol Aldose (1,34g 2-Desoxyribose) und 2,76g BaCO_3 (0,014mol) in 150ml Wasser lösen, 0,6ml Br_2 (0,012mol) zugeben, schütteln, bis sich das Brom gleichmäßig verteilt hat und 36h im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahren. Danach zur Entfernung überschüssigen Broms bei offenem Gefäß kräftig rühren, bis die Lösung klar ist. 13,75ml 2n H_2SO_4 (0,014mol) zugeben, BaSO_4 abfiltrieren. Die Lösung unter reduziertem Druck einengen und 2h bei ca. 75°C Wasserbadtemperatur zur Vervollständigung der Lactonisierung weiterrotieren. Bei der Destillation am Hochvakuum (0,1Torr) geht das Lacton als farbloses Öl bei ca. 75°C über.

$R_f=12,80$ min

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz): ppm 2,42 (dd, $J=18$ u. 4Hz, 1H), 2,94 (dd, $J=18$ u. 8Hz, 1H), 3,72 (dd, $J=12$ u. 4Hz, 1H), 3,79 (dd, $J=12$ u. 4Hz, 1H), 4,42 (dt, $J=4$ u. 2Hz, 1H), 4,47 (dt, $J=6$ u. 2Hz, 1H)

MS (m/e) (silyl.): 261 (25%, $\text{M}^{++}-15$), 219 (15), 189 (25), 171 (11), 147 (34), 103 (45), 97 (39), 73 (100)

IR (NaCl): 2965, 1760, 1400, 1360, 1180, 1080, 1050, 930. 895, 820 cm^{-1}

3.1.2. Erythronolacton (58)

Die Synthese erfolgt aus der Erythrose nach der Arbeitsvorschrift unter 3.1.1.

$R_f=10,80$ min

MS (m/e) (silyl.): 262 (13%, M^{+}), 247 (44), 219 (13), 189 (17), 147 (72), 116 (13), 103 (31), 73 (100)

3.1.3. Metasaccharinsäurelacton (60)

60 war im Arbeitskreis nach Literaturangaben (28) hergestellt worden.

$R_f=18,23$ min

MS (m/e) (silyl.): 378 (8%, M^{+}), 363 (5), 292 (9), 273 (21), 246 (15), 245 (14), 205 (18), 155 (19), 147 (38), 129 (45), 103 (21), 73 (100)

3.1.4. 2-Desoxyerythronolacton (62)

4,06g m-Chlorperbenzoesäure (0,024mol) in 150ml $CHCl_3$ lösen, 1,72g Vinyllessigsäure (0,02mol) in wenig $CHCl_3$ unter Eiskühlung zugeben, 48h bei Raumtemperatur stehenlassen. Das Lösungsmittel weitgehend entfernen, den Rückstand in einen 63-Filtertiegel überführen und dreimal je ca.5ml Wasser schnell durchsaugen, wobei das Epoxid herausgelöst wird. Danach die wäßrige Phase zur Entfernung mitgelöster m-Chlorbenzoesäure einmal mit Ether nachwaschen.

Das so erhaltene Epoxid nach Zugabe von 2 Tropfen 2n HCl und zweistündigem Erhitzen am Rückfluß öffnen.

Die wäßrige Lösung unter reduziertem Druck einengen und das restliche Wasser bei 50°C Wasserbadtemperatur am Hochvakuum weitgehend entfernen.

R_t=6,34 min

MS (m/e) (silyl.): 159 (21%, M⁺-15), 117 (100), 101 (22), 89 (19), 75 (20), 73 (29), 59 (10)

IR (NaCl): 3400, 2940, 1765, 1170, 1075, 1040, 980, 955 cm⁻¹

3.2. Säuren

3.2.1. Milchsäure (18), Glykolsäure (33) und Glycerinsäure (34)

Die Substanzen waren im Handel erhältlich.

18: R_t=4,15 min

MS (m/e) (silyl.): 219 (19%, M⁺-15), 191 (27), 190 (28), 147 (37), 117 (86), 98 (16), 75 (31), 73 (100), 66 (23)

33: R_t=4,32 min

MS (m/e) (silyl.): 205 (24%, M⁺-15), 177 (15), 161 (7), 147 (92), 133 (7), 73 (100), 66 (22)

34: R_t=9,30 min

MS (m/e) (silyl.): 307 (9%, M⁺-15), 292 (28), 205 (10), 189 (37), 147 (50), 103 (21), 102 (20), 75 (14), 73 (100)

3.2.2. Erythronsäure (22), 2-Desoxyerythronsäure (37), 2-Desoxyribonsäure (35) und Ribonsäure (36)

Die Säuren wurden aus ihren Lactonen freigesetzt:

Ca. 150mg Lacton mit 3ml 1N NaOH 2h am Rückfluß erhitzen, das Wasser schonend entfernen und silylieren.

22: $R_E=13,97$ min

MS (m/e) (silyl.): 409 (7%, M^+-15), 379 (4), 292 (40), 220 (23), 217 (15), 205 (27), 147 (61), 130 (10), 117 (18), 103 (14), 73 (100)

37: $R_E=11,34$ min

MS (m/e) (silyl.): 321 (13%, M^+-15), 246 (15), 233 (34), 231 (19), 191 (15), 189 (40), 147 (48), 133 (11), 129 (11), 117 (15), 101 (11), 73 (100)

35: $R_E=16,43$ min

MS (m/e) (silyl.): 423 (2%, M^+-15), 348 (3), 335 (5), 306 (5), 217 (10), 205 (11), 147 (30), 129 (9), 117 (12), 73 (100)

36: $R_E=18,56$ min

MS (m/e) (silyl.): 511 (4%, M^+-15), 421 (4), 333 (17), 307 (16), 292 (70), 217 (50), 189 (19), 147 (53), 103 (45), 73 (100)

3.2.3. β -Hydroxypropionsäure (32)

1,08g 3-Chlorpropionsäure (0,01mol) und 0,4g NaOH (0,01mol) in 5ml Wasser 4h am Rückfluß erhitzen, das Lösungsmittel schonend einrotieren und den Rückstand silylieren.

$R_f=5,45$ min

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz): ppm 2,40 (t, 2H), 3,77 (t, 2H)

MS (m/e) (silyl.): 219 (40%, $\text{M}^{++}-15$), 177 (32), 147 (100), 116 (9), 75 (16), 73 (46), 66 (13)

3.3. Ester

3.3.1. Synthese von 3-O-(2-Hydroxypropionyl)-3-hydroxypropionsäure (64) im Gemisch

0,9g Hydroxypropionsäure (0,01mol) und 0,9g Milchsäure (0,01mol) in 4ml Wasser lösen, mit H_2SO_4 auf pH4 einstellen und 3h am Rückfluß erhitzen, das Lösungsmittel weitgehend unter reduziertem Druck entfernen und den Rückstand silylieren.

$R_f=12,60$ min

MS (m/e) (silyl.): 291 (5%, $\text{M}^{++}-15$), 262 (3), 219 (31), 218 (16), 191 (5), 177 (8), 147 (19), 145 (18), 129 (31), 117 (100), 103 (25), 73 (84)

3.3.2. Herstellung von 64 aus 4-O- β -D-Galactopyranosyl-2-hydroxy-2-methyl-2H-pyran-3(6H)-on (78b)

Aus 78b mit β -Galaktosidase (Boehringer Mannheim Nr. 105031) den Galaktoserest nach Herstellerangaben abspalten, das

Lösungsmittel weitgehend entfernen und den Rückstand silylieren.

R_f des Hauptprodukts: 12,60 min

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 60MHz): ppm 1,45 (d, 3H), 2,5 (t, 2H), 4,15 (q, 1H), 4,2 (t, 2H)

MS (m/e) (silyl.) ist identisch mit den Daten aus 3.3.1.

3.3.3. Synthese von 3-O-Acetylglycerinsäure (82) und 2-O-Acetylglycerinsäure (83) im Gemisch

0,80g Glycerinsäure (7,55mmol) in 15ml wasserfreiem Pyridin lösen, 0,86g Acetanhydrid (8,5mmol) zugeben, 48h bei Raumtemperatur stehenlassen und das Lösungsmittel sowie freigesetzte Essigsäure unter reduziertem Druck weitgehend entfernen.

82 und 83 entstehen ca. im Verhältnis 1:1 (lt. Integration des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Gemisches)

82: R_f =9,55 min

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 60MHz): ppm 2,2 (s, 3H), 4,4-4,7 (m, 3H)

83: R_f =9,60 min

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 60MHz): ppm 2,3 (s, 3H), 4,1 (d, 2H), 5,2 (t, 1H)

MS (m/e) (silyl., Substanz aus dem Glucose/Glycin-Umsetzungsgemisch nach mehreren Plattentrennungen von 82 abgetrennt): 277 (10%, $M^{+}-15$), 235 (9), 217 (22), 175 (80), 159 (22), 147 (54), 133 (38), 117 (84), 101 (34), 73 (100)

3.3.4. Synthese von Glycerinsäuremethylester (89)

286mg Ca-glycerat (1mmol) mit 3ml methanolischer HCl 3h am Rückfluß erhitzen und das Lösungsmittel weitgehend einrotieren. Bei der Destillation am Hochvakuum (0,1 Torr) erhält man ein farbloses Öl bei 80-100°C.

R_f =7,01 min

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 60MHz): ppm 3,6-3,9 (m, 5H), 4,2 (t, 1H)

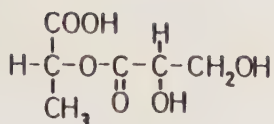
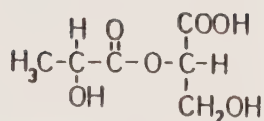
MS (m/e) (silyl.): 249 (16%, M^+-15), 234 (42), 205 (10), 189 (12), 147 (56), 130 (26), 117 (58), 1103 (47), 89 (14), 73 (100)

IR (NaCl): 3400, 1735, 1430, 1225, 1115, 1045 cm^{-1}

3.3.5. Synthese von 3-O-(2-Hydroxypropionyl)-glycerinsäure (88) im Gemisch

1.06g Glycerinsäure (0,01mol) und 0,9g Milchsäure (0,01mol) in 5ml Acetonitril unter Zusatz von 10 Tropfen 2n H_2SO_4 3h am Rückfluß erhitzen, das Lösungsmittel unter reduziertem Druck weitgehend entfernen und den Rückstand silylieren.

In sehr geringen Mengen entsteht dabei eine Verbindung mit der Masse 394, deren Massenspektrum mit der aus dem Glucose/Glycin-Umsetzungsgemisch isolierten Verbindung identisch ist. Die Entstehung aus Substanz 5 unter oxidativen Bedingungen (s. 6.) läßt den Schluß zu, daß es sich um den Ester 88 und nicht um die ebenfalls möglichen Ester 122 bzw. 123 handelt.

122123R_e=15,62 min

MS (m/e) (silyl.): 379 (2%, M⁺-15), 307 (9), 277 (11),
 219 (12), 217 (11), 205 (5), 189 (11), 147 (35), 117 (100), 101
 (18), 77 (33), 73 (90)

3.4. Säureamide

3.4.1. Synthese von N-Formylglycin (99)

Die Synthese erfolgte nach Literaturangaben (76).

$R_t=6,65$ min

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 60MHz): ppm 4,1 (s, 2H), 8,3 (s, 1H)

MS (m/e) (silyl.): 160 (14%, $\text{M}^{++}-15$), 147 (6), 131 (13), 116 (4), 75 (58), 73 (100)

3.4.2. Synthese von N-Acetylglycin (98)

7,5g Glycin (0,1mol) und 70ml Acetanhydrid über Nacht rühren, 40ml Eiswasser zugießen, 1h rühren, Lösungsmittel abziehen, bis weiße, kristalline Substanz ausfällt, absaugen, mit Wasser nachwaschen und am Hochvakuum trocknen.

Weißer, grobkörniger Substanz, Smp. (Lit.): 206°C .

$R_t=7,57$ min

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 60MHz): ppm 2,1 (s, 3H), 4,0 (s, 2H)

MS (m/e): 117 (65%, M^{++}), 99 (80), 73 (80), 72 (90), 56 (60), 43 (100)

MS (m/e) (silyl.): 175 (18%, $\text{M}^{++}-15$), 145 (16), 133 (8), 130 (11), 104 (13), 75 (39), 73 (100)

3.4.3. Synthese von Glykolsäurepropylamid (93)

2,9g Glykolsäurebutylester (0,025mol) und 2,95g Propylamin (0,05mol) 2h am Rückfluß erhitzen. Danach überschüssiges Propylamin und Butanol am Hochvakuum bei 35°C Wasserbadtemperatur weitgehend entfernen.

Bei der Destillation am Hochvakuum (0,1Torr) erhält man ein farbloses Öl bei 80-100°C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60MHz): ppm 0,85 (t, 3H), 1,5 (sextett, 2H), 3,2 (q, 2H), 4,1 (s, 2H), 4,9 (s, 1H), 7,1 (s, breit, 1H)

MS (m/e): 117 (80%, M^+), 102 (35), 101 (40), 88 (40), 86 (70), 60 (30), 57 (60), 43 (100)

3.4.4. Synthese von Erythronsäurepropylamid (94) und 2-Desoxyribonsäurepropylamid (101)

Die Synthese erfolgte nach einer allgemeinen Arbeitsvorschrift von Lehrfeld (77) aus Erythronolacton (58) und 2-Desoxyribonolacton (7)

3.4.5. Synthese von Essigsäurepropylamid (90b)

1,95g Acetylchlorid (0,025mol) in 40ml Dioxan lösen, 5,9g Propylamin (0,1mol) langsam zutropfen, filtrieren und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck weitgehend entfernen. Bei der Destillation am Hochvakuum (0,1 Torr) erhält man ein farbloses Öl bei ca. 60°C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60MHz): ppm 0,9 (t, 3H), 1,5 (sextett, 2H), 2,0 (s, 3H), 3,2 (q, 2H), 7,6 (s, breit, 1H)

MS (m/e): 101 (35%, $\text{M}^{+\cdot}$), 86 (15), 72 (40), 60 (20), 58 (20), 43 (80), 30 (100)

3.4.6. Synthese von Ameisensäurepropylamid (91b)

1,11g Ameisensäureethylester (0,015mol) und 1,48g Propylamin (0,025mol) 1h am Rückfluß erhitzen und die Lösung weitgehend einengen.

Verbindung 91b geht bei der Destillation am Hochvakuum (0,1 Torr) bei 60°C als helles, klares Öl über.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60MHz): ppm 1,0 (t, 3H), 1,6 (quintett, 2H), 3,3 (q, 2H), 8,25 (s, 1H)

MS (m/e): 87 (45%, $\text{M}^{+\cdot}$), 72 (45), 58 (65), 46 (40), 41 (40), 30 (85), 28 (100)

3.5. Isolierung von N-Propyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-2-aldehyd (112)

19,8g Glucose-Monohydrat (0,1mol), 11,8g Propylamin (0,2mol) und 12g Eisessig (0,2mol) in 100ml Wasser am Rückfluß erhitzen. Die wäßrige Lösung 3h mit CH_2Cl_2 extrahieren, das Lösungsmittel weitgehend entfernen und den Rückstand am Hochvakuum (0,1Torr) bis 120°C destillieren.

Das Destillat auf präparativen Platten (2mm) mit Toluol/Essigester 2:1 trennen (R_f (112)=0,25-0,30). 112 zeigt

beim Besprühen mit Diphenylamin/Anilin in phosphorsaurem Aceton eine gelb-grüne Färbung.

$R_f=13,21$ min

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60MHz): ppm 0,9 (t, 3H), 1,7 (quintett, 2H), 2,8 (s, 1H), 4,35 (t, 2H), 4,7 s, (2H), 6,25 (d, 1H), 6,9 (d, 1H), 9,5 (s, 1H)

3.6. Im Arbeitskreis vorhandene Vergleichssubstanzen

N-Carboxymethyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-2-aldehyd (63):

$R_f=19,11$ min

MS (m/e) (silyl.): 327 (25%, M^{+}), 312 (23), 298 (100), 272 (7), 209 (7), 180 (8), 147 (15), 120 (8), 108 (5), 103 (5), 73 (79)

2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on (5): $R_f=11,56$ min

MS (m/e) (silyl.): 288 (10%, M^{+}), 273 (56), 245 (8), 217 (10), 205 (14), 183 (10), 155 (17), 147 (36), 133 (12), 116 (10), 101 (12), 73 (100)

3,5-Dihydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-on (6): $R_f=12,41$ min

MS (m/e) (silyl.): 286 (7%, M^{+}), 271 (100), 213 (5), 199 (14), 147 (6), 133 (6), 123 (18), 113 (4), 73 (25)

4-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-3(2H)-furanon (8):

$R_f=14,40$ min

MS (m/e) (silyl.): 360 (20%, M⁺), 345 (27), 271 (21), 255 (20), 227 (4), 195 (9), 183 (13), 181 (9), 147 (22), 75 (58), 73 (100)

4. Isolierung der Säuren aus dem Zucker/Amin-Umsetzungsgemisch

Zucker/Glycin-Umsetzungsgemisch (s.2.) unter reduziertem Druck weitgehend einrotieren, den Rückstand zur Entfernung der Hauptmenge des Phosphats in warmem Methanol aufnehmen, filtrieren, das Lösungsmittel wieder entfernen und den Rückstand in Wasser aufnehmen. 20 ml Amberlite IRA-400 UH⁻-Form (stark basischer Ionenaustauscher) zugeben, 1h kräftig rühren, den Ionenaustauscher in eine Säule füllen und gründlich mit Wasser waschen. Die Säuren mit 20 ml 1n NaOH von der Säule eluieren, die basische Lösung neutralisieren, unter reduziertem Druck weitgehend einengen und silylieren.

5. Auftrennung des Extrakts aus dem Glucose/Glycin-Umsetzungsgemisch

5.1. Vortrennung

Die aus 35 Glucose/Glycin-Umsetzungen (s.2.) gesammelten Extrakte wurden an präparativen Platten (2mm) mit Essigester/Methanol 98:2 aufgetrennt und in 11 Zonen unterteilt:

Zone	R _f -Wert	Besonderheiten
1	0,00-0,10	

2	0,10-0,12	gelbe Substanz(en)
3	0,12-0,19	
4	0,19-0,22	gelbe Substanz(en)
5	0,22-0,45	
6	0,45-0,55	gelbe Substanz(en)
7	0,55-0,65	schwach UV-löschend
8	0,65-0,75	
9	0,75-0,85	schwach UV-löschend
10	0,85-0,90	stark UV-löschend
11	0,90-1,00	

5.2. Isolierung des Esters 64

Plattenzone 5 (s.5.1.) an präparativen Platten (0,5mm) mit Essigester/Methanol 98:2 trennen ($R_f(\underline{64})=0,05-0,35$).

Diese Zone nochmals an präparativen Platten (0,5mm) mit Essigester/Methanol 2:3 trennen ($R_f(\underline{64})=0,75-0,90$).

Verbindung 64 ist stets mit 63 verunreinigt, im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erkennt man anhand der Integration, daß in etwa gleiche Mengen dieser Substanzen vorliegen.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400MHz): ppm

63: 4,6 (s, 2H), 5,2 (s, 2H), 6,3 (d, 1H), 6,95 (d, 1H)
9,4 (s, 1H)

64: 1,4 (d, 3H), 2,55 (t, 2H), 4,25 (q, 1H), 4,35 (t, 2H)

5.3. Isolierung der Ester 82 und 83

Plattenzone 9 und 10 (s.5.1.) an preparativen Platten (0,5mm) mit Essigester/Methanol 100:1 auftrennen (R_f (82/83)=0,0-0,15). $^1\text{H-NMR}$ siehe B.3.3.

Zur Strukturabsicherung der Ester wurde eine kleine Menge der isolierten Plattenzone in 3ml Wasser aufgenommen und mit 5 Tropfen 2n NaOH 2h am Rückfluß erhitzt, mit HCl neutralisiert, das Wasser unter reduziertem Druck weitgehend entfernt und der Rückstand silyliert. Das Hauptprodukt war Glycerinsäure (34).

5.4. Weitere Reaktionsprodukte

Alle weiteren Substanzen konnten nicht rein isoliert werden. Sie wurden jeweils im Gemisch nach verschiedenen Plattentrennungen mit Hilfe von Massenspektren der Trimethylsilyl-Derivate identifiziert.

6. Oxidative Spaltung von 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on (5) und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (59)

144mg 5 bzw. 128mg 59 (1mmol) in 5ml Wasser lösen, mit Eisessig auf pH 5 einstellen und 254mg I_2 (1mmol) -gelöst in wenig Wasser - langsam zutropfen. Die Lösung neutralisieren, das Wasser unter reduziertem Druck weitgehend entfernen und den Rückstand silylieren.

7. Herstellung von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-1-norleucin (110) als Vergleichssubstanz

7.1. Synthese von N^α-Acetyllysin (111)

Die Synthese erfolgte leicht modifiziert nach Literaturangaben (37)

7.2. Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Ausbeute an N-Propyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-2-aldehyd (112)

Glucose und Propylammoniumacetat (in unterschiedlichen molaren Verhältnissen) in 20ml wäßriger Pufferlösung bzw. Ethanol 3h am Rückfluß erhitzen. Danach 3h mit CH₂Cl₂ extrahieren, das Lösungsmittel weitgehend entfernen, den Rückstand silylieren und den Gehalt an 112 sowie 5 über die Integration der Peakflächen am GC bestimmen (Ergebnisse s. Tab.1, S.55)

7.3. Herstellung von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-1-(N^α-acetyl)-norleucin (113)

3,384g N^α-Acetyllysin (18mmol) mit 0,891g Glucose-Monohydrat (4,5mmol) in 60ml Ethanol unter Zugabe von 20 Tropfen Eisessig mischen.

Die Suspension (sowohl N^α-Acetyllysin als auch Glucose lösen sich schlecht in Ethanol) 24h bei 85°C unter Rückfluß rühren und anschließend filtrieren. Den Filtrerrückstand wieder in 60ml Ethanol suspendieren und nach Zugabe von 15 Tropfen Eisessig

und 0,8g Glucose-Monohydrat erneut wie oben umsetzen. Dies insgesamt 4mal wiederholen.

Die gesammelten Ethanol-Filtrate, die als Hauptprodukt 113 enthalten, auf Kieselgel aufziehen (Korngröße.40-63µm) und an einer naß mit Essigester/MeOH 2:1 gefüllten Säule trennen. Die Trennung wird mit DC verfolgt (Kieselgel, Fließmittel Ester/MeOH 2:3, $R_f=0,5$, UV-Detektion und Besprühen mit Dinitrophenylhydrazin: rostbraune Färbung).

Säulentraktionen à 50 ml, Elutionsmittelgradient:

Frk. 1 - 5	Ester/MeOH	2:1
Frk. 6 - 11	" / "	1:1
Frk. 12 - 18	" / "	2:3
Frk. 19 - 25	" / "	1:3

Fractionen 12 - 22 enthielten 113. Das Material erneut auf Kieselgel aufziehen und eine zweite Säulen-Trennung unter identischen Bedingungen durchführen.

Nach dem Einrotieren erhält man ein gelbes, kristallines, mit Kieselgel verunreinigtes Rohprodukt (ca. 300mg).

¹H-NMR (CD₃OD, 60MHz): ppm 1,7 (m, 6H), 2,0 (s, 3H), 4,3 (m, 3H), 4,7 (s, 2H), 6,3 (d, 1H), 7,0 (d, 1H), 9,45 (s, 1H)

7.4. Abspaltung der Acetylgruppe und Reinigung von 110

7.4.1. Basenhydrolyse und Trennung an Kieselgelplatten

150mg Rohprodukt 113 aus 7.3. mit 4ml 5n Ba(OH)₂-Suspension 40h am Rückfluß erhitzen, ungelöstes Ba(OH)₂ abfiltrieren, die Lösung mit 2n H₂SO₄ neutralisieren, das ausgefallene BaSO₄

abfiltrieren und den Filtrerrückstand mit Wasser gut nachwaschen. Die wäßrige Lösung unter reduziertem Druck stark einengen und auf Kieselgelplatten (0,5mm Schichtdicke) auftragen.

Fließmittel AcCN/EtOH/H₂O 4:1:1, UV und Ninhydrinreaktion, $R_f=0,2$.

Die Substanz 110 wird mit heißem Methanol vom Kieselgel eluiert.

(Ausbeute ca. 10mg)

7.4.2. Enzymhydrolyse und HPLC-Reinigung

Zu 150mg Rohprodukt aus 7.3. in 7,0ml Phosphatpuffer (pH=8,0) gibt man 100mg Acylase (aus *Aspergillus species*, Sigma Nr. A-2156) und inkubiert 36h bei 37°C.

Die Reinigung erfolgt an einer semipräparativen RP-18-Säule: Elutionsmittel AcCN/H₂O 1:9, 2ml/min, UV-Detektion $\lambda=296\text{nm}$, $R_t=11,0$ min. Nach dem Auffangen des Hauptpeaks die Säule mit AcCN/H₂O 7:3 waschen.

Diese HPLC-Reinigung wiederholen, wobei das Nachwaschen der Säule jetzt unterbleiben kann.

(Ausbeute ca. 10mg)

Kontrolle der Reinheit durch ¹H-NMR-Spektrum und Vergleich mit Daten aus der Literatur (53): >95% reine Substanz.

¹H-NMR (D₂O, 400MHz): ppm 1,3 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 3,6 (t, 1H), 4,15 (t 2H), 4,6 (s, 2H), 6,25 (d, 1H), 7,0 (d, 1H), 9,2 (s, 1H)

8. Umsetzungen von Rinderserumalbumin mit Glucose

a) 1,82g Rinderserumalbumin (Serva Nr. 11930) und 2,5g Glucose-Monohydrat (≈ 10 -fach molarem Überschuß von Glucose bezogen auf den Lysingehalt des Proteins) in 25 ml Citratpuffer pH=5,0 bei 37°C 4 Wochen inkubieren.

b) 1,82 g Rinderserumalbumin und 2,5g Glucose H₂O in 25ml Phosphatpuffer pH=7,0 3 Wochen unter Rühren und Rückfluß auf 45-50°C halten.

9. Aufarbeitung der Proteinlösungen

9.1. Dialyse

Die Proteinlösungen werden 72h gegen dest. Wasser dialysiert (Ausschlußgewicht des Dialyseschlauchs ca. 12000 u).

Anschließend das Wasser unter reduziertem Druck weitgehend entfernen und das Protein am Hochvakuum gründlich trocknen.

9.2. Hydrolyse

200mg Protein aus 9.1. in 45ml 5n NaOH 16h bei 120°C im evakuierten Autoklaven erhitzen, dann mit HCl neutralisieren, filtrieren und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck weitgehend abrotieren.

9.3. HPLC-Vortrennung des Proteinhydrolysats

Aminosäuren/NaCl-Mischung aus 9.2. in möglichst wenig Elutionsmittel Triethylammoniumformiat/lsg. pH=6,0/MeOH 8:2 aufnehmen (ca. 60ml). Jeweils 5ml davon auf eine RP-18-Niederdrucksäule geben: UV-Detektion bei 254nm, 2ml/min, Fraktionssammler 450 Tropfen à Fraktion. Fraktionen 16, 17 und 18 jeweils sammeln, das Lösungsmittel weitgehend entfernen und den Puffer am Hochvakuum bei ca. 90°C Wasserbadtemperatur abziehen.

Die weitere Reinigung des Rückstands der gesammelten Fraktionen 16-18 erfolgt an einer semipräparativen RP-18-Säule mit 0,1M Triethylammoniumformiat /MeOH 9:1, 2ml/min, UV-Detektion bei 296nm.

$R_F(\text{Tryptophan})=24,9\text{min}$, $R_F(\text{110})=26,5\text{min}$.

Die Fraktion, die die Substanz 110 enthält, sammeln, das Lösungsmittel und den Puffer unter reduziertem Druck weitgehend entfernen und einen Teil des Rückstandes in wenig Wasser aufnehmen.

10. Nachweisverfahren für 110 nach der Vortrennung

10.1. Thiobarbitursäuretest

1ml wäßrige Probenlösung aus 9.3. zusammen mit 2ml Thiobarbitursäurelösung (0,025M in 1M H_3PO_4) mit Wasser im Meßzylinder auf 10ml auffüllen, 30min bei 75°C im Trockenschrank inkubieren und dann sofort bei 455nm gegen eine Blindprobe messen.

10.2. Aminosäure-Analysator

Die vorgetrennte, trockene Probe in wenig Citratpuffer pH=2,2 aufnehmen und davon 100µl am LKB-4400-Aminosäure-Analysator einspritzen. Die Detektion erfolgt nach Ninhydrin-Reaktion photometrisch bei 570nm.

R_t(110)=41,2 min.

10.3. Fluoreszenzreaktion und HPLC/Fluorimeter bzw. HPLC/UV

100µl wäßrige Probenlösung aus 9.3., 10µl

Trichloressigsäurelösung (10% g/g in H₂O) und 50µl

Dansylhydrazinlösung (5% g/g in AcCN) zusammen 20min bei 65°C

inkubieren, 1:1 mit Wasser verdünnen und sofort zur HPLC-

Bestimmung einsetzen. Eine Blindprobe mit 100µl dest. Wasser

wird identisch behandelt. Die Proben können ca. 1h im Eis unter

Ausschluß von Licht aufbewahrt werden.

HPLC-Bedingungen: RF=18 5µm, 1ml/min, Elutionsmittel 0,02M

wäßr. Ameisensäurelsg/AcCN 50:50, nach 16min auf 70:30

gewechselt.

Fluoreszenzdetektor: Anregung λ=370nm, Emission λ=540nm (als

Alternative UV-Detektion bei λ=300nm)

R_t(dansylierte Verbindung 110)=12,8 min

10.4. HPLC/UV

Die vorgetrennte, trockene Probe aus 9.3. in wenig

Elutionsmittel aufnehmen.

HPLC-Bedingungen: RP-18 5µm, 1ml/min. Elutionsmittel 0,1M Triethylammoniumformiatlösung pH=6,0/Methanol 9:1, λ =296nm.
 $R_F(110)$ =18,25 min.

10.5. MS/MS

Die vorgetrennte, trockene Probe aus 9.3. wird in wenig Glycerin aufgenommen, mit beschleunigten Argon-Atomen ionisiert, die Masse 255 (M^+) wird in ein zweites Massenspektrometer gelenkt und durch Elektronenstoß ionisiert.

MS/MS (m/e) (110): 255 (84%, M^+), 237 (51), 219 (5), 175 (100), 163 (13), 148 (70), 96 (14), 84 (86), 74 (11)

11. Katalytische Reduktion von N-Propyl-2,5-di(hydroxymethyl)-pyrrol (118a)

11.1. Natriumborhydrid-Reduktion von N-Propyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol-2-aldehyd (112)

167mg 112 (1mmol) in einer Mischung aus 2ml Isopropanol und 2ml Wasser lösen und 96mg Natriumborhydrid (2mmol) unter Rühren bei Raumtemperatur langsam zugeben.

Überprüfung der Reduktion mit DC: Laufmittel Toluol/Essigester 2:1, $R_F(112)$ =0,2, $R_F(118a)$ =0,1

Nach Abschluß der Reduktion das Lösungsmittel weitgehend entfernen und den Rückstand am Hochvakuum (0,1Torr) destillieren. Verbindung 118a kondensiert bei 80-90°C als leicht gelbliches Öl in der Destillationsbrücke.

¹H-NMR (CDCl₃, 60MHz): ppm 0,8 (t, 3H), 1,6 (quintett, 2H), 2,4 (s, 2H), 3,3 (q, 2H), 4,5 (s, 4H), 6,0 (s, 2H)

Das Pyrrol 118a ist am Licht nicht stabil und muß möglichst schnell weiterverarbeitet werden.

11.2. Katalytische Reduktion von 118a zu N-Propyl-2,5-di(hydroxymethyl)-pyrrolidin (119a)

169mg 118a (1mmol) in einer Mischung von je 4ml Wasser und Methanol lösen, 1 Spatelspitze Katalysator - 5% Rhodium auf Aluminium - zugeben. In einer Hydrierungs-Apparatur 24h unter Rühren bei Normaldruck hydrieren.

Das Lösungsmittel unter reduziertem Druck weitgehend entfernen und am Hochvakuum (0,1Torr) destillieren. Man erhält bei ca.75°C ein farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 60MHz): ppm 0,9 (t, 3H), 1,6 (quintett, 2H), 1,8 (m, 2H), 2,75 (t, 2H), 3,0 (m, 2H), 3,25 (s, 2H), 3,55 (d, 2H)

Literaturverzeichnis

- (1) Maillard L.C., U.K.Acad.Sci 154, 66 (1912)
- (2) Baltes W., Lebensm.chem.u.Ger.Chem. 34, 39 (1980)
- (3) Mills F.D., Hodge J.E., Tjarks C.W., J.Urg.Chem. 46, 3597 (1981)
- (4) Adrian I., in: Handbook of Nutritive Value of Processed Food, Rechcigl M. Hrsg., CRC Boca Raton FL Vol.I, S.529 (1982)
- (5) Einarsson H., Snygg B.G., Eriksson C.J., J.Agric.Food Chem. 31, 1043 (1983)
- (6) Shibamoto T., in: Instrumental Analysis of Foods, Caralam-bous G, Inglett G. Hrsg., Academic New York Vol.I, S.229 (1983)
- (7) Öste R., Miller R., Sjöström H., Norén O., J.Agric.Food Chem. 35, 938 (1987)
- (8) v.Wangenheim B., Hänicken T., Erbersdobler H.F., Z.Ernäh-rungswiss. 23, 219 (1984)
- (9) Monnier V.M., in: Amino-Carbonyl-Reactions in Food and Biological Systems, Fujimaki M., Namiki M., Katō H. Hrsg., Elsevier Amsterdam, S.459 (1986)
- (10) Paulsen H., Pflughaupt K.W., in: The Carbohydrates, Chem. and Biochem., Pigman W., Horton D. Hrsg., Academic New York, S.881 (1980)
- (11) Angrick M., Rewicki D., Chem.in uns.Zeit 14, 149 (1980)
- (12) Olsson K., Pernemalm P.-A., Theander U., Acta Chem.Scand B 32, 249 (1978)
- (13) Hiehl J., Ledl F., Severin Th., J.Agric.Food Sci. 35, 990 (1987)
- (14) Beck J., Diss. Univ. München (1988)
- (15) Ledl F., Schnell W., Severin Th., Z.Lebensm.Unters.Forsch. 160, 367 (1976)
- (16) Ledl F., Lebensm.chem.u.Ger.Chem. 41, 83 (1987)
- (17) Feather M.S., Harris J.F., Adv.Carbohydr.Chem.Biochem. 28, 161 (1973)
- (18) Shaw P.E., Tatum J.H., Berry R.E., Carbohydr.Res. 5, 266 (1967)

- (19) Shaw P.E., Tatum J.H., Berry R.E., J.Agric.Food Chem. 17, 907 (1969)
- (20) Ishizu A., Lindberg B., Theander O., Carbohydr.Res. 5, 329 (1967)
- (21) Lindberg B., Theander O., Acta Chem.Scand. 22, 1782 (1968)
- (22) Pfeilsticker K., Marx F., Lebensm.chem.Ger.Chem 30, 41 (1976)
- (23) Hayase F., Kato H., Agric.Biol.Chem. 49, 467 (1985)
- (24) Hicks K.B., Carbohydr.Res. 145, 312 (1986)
- (25) Machell G., Richards G.N., J.Chem.Soc., 1938 (1960)
- (26) Pernemalm P.-A., Doctoral thesis, Swedish Univ. of Agric. Sci., S.9 (1978)
- (27) Takagi M., Morita N., in: Amino-Carbonyl-Reactions in Food and Biological Systems, Fujimaki M., Namiki M., Kato H. Hrsg., Elsevier Amsterdam, S.49 (1986)
- (28) Corbett W.M., in: Methods in Carbohydrate Chem. Vol.II, Academic New York, S.482 (1963)
- (29) Camps P., Font J., Ponsati O., Tetrah.Lett. 22, 1471 (1981)
- (30) Loidl A., Diss. Univ. München (1976)
- (31) Matsuura H., Hirao Y., Yoshida S., Kunihiro K., Fuwa T., Kasai R., Tanaka O., Chem.Pharm.Bull. 32, 4674 (1984)
- (32) Ledl F., Ellrich G., Klostermeyer H., Z.Lebensm.Unters. Forsch. 182, 19 (1986)
- (33) Hayase F., Kim S.B., Kato H., Agric.Biol.Chem. 49, 2337 (1985)
- (34) Hayashi T., Namiki M., Agric.Biol.Chem. 44, 2575 (1980)
- (35) Kim S.B., Hayase F., Kato H., Agric.Biol.Chem. 49, 785 (1985)
- (36) Erbersdobler H.F., in: Amino-Carbonyl-Reactions in Food and Biological Systems, Fujimaki M., Namiki M., Kato H. Hrsg., Elsevier Amsterdam, S.481 (1986)
- (37) Pachmayr O., Diss. Univ. München (1986)
- (38) Finot P.A., Magnenat E., Prog.Food Nutr.Sci., 193 (1981)
- (39) Erbersdobler H.F., Holstein B., Lainer E., Z.Lebensm.

Unters.Forsch. 168, 6 (1979)

- (40) Erbersdobler H.F., Reuter H., Trautwein E., in: Challenges to Contemporary Dairy Analytical Techniques, Royal Society of Chemistry Hrsq. S.328 (1984)
- (41) Büser W., Erbersdobler H.F., J.Chrom. 346, 363 (1985)
- (42) Schleicher E., Wieland O.H., J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 19, 81 (1981)
- (43) Chiang G.H., J.Agric.Food Chem. 31, 1373 (1983)
- (44) Erbersdobler H.F., Lebensm.chem.u.Ger.Chem., 41, 87 (1987)
- (45) Hurrell R.F., Finot P.A., Ford J.E., Brit.J.Nutr. 49, 343 (1983)
- (46) Vogt B.W., Schleicher H.D., Wieland O.H., Diabet. 31, 1123 (1982)
- (47) Dimomi M., Hatamaka H., Ishikawa K., Kubota S., Yoshimura Y., Baba S., Klin.Wochenschr. 62, 477 (1984)
- (48) Garlick R.L., Mazer J.S., J.Biol.Chem. 258, 6142 (1983)
- (49) Baynes J.W. et al., in: Amino-Carbonyl-Reactions in Food and Biological Systems, Fujimaki M., Namiki M., Kato H. Hrsq., Elsevier Amsterdam, S.421 (1986)
- (50) Ahmed M.U., Thorpe S.R., Baynes J.W., Fed.Proc. 44, 1621 (1985)
- (51) Wadman S.K., De Bree P.K., Van Sprang F.J., Kamerling J.P., Haverkamp J., Vliegenthart J.F.G., Clin.Chim.Acta 59, 313 (1975)
- (52) Liardon R., Weck-Gaudard D., Philipossian G., Finot P.-A., J.Agric.Food Chem. 35, 427 (1987)
- (53) Büser W., Erbersdobler H.F., Liardon R., J.Chrom. 387, 515 (1987)
- (54) Jurch G.R., Tatum J.H., Carbohydr.Kes. 15, 233 (1970)
- (55) Olsson K., Ferneman P.-A., Theander U., Acta.Chem.Scand. B 32, 249 (1978)
- (56) Hayase F., Kato H., Agric.Biol.Chem. 49, 467 (1985)
- (57) Njoroge F.G., Sayre L.M., Monnier V.M., Carbohydr. Res. 167, 211 (1987)
- (58) Nakayama I., Hayase F., Kato H., Agric.Biol.Chem. 44, 1201 (1980)

- (59) Olsson K., Pernemalm P.-A., Theander O., Prog.Food Nutr.Sci. 47 (1981)
- (60) Miller R., Olsson K., Acta Chem.Scand. B 39, 717 (1985)
J.Am.Chem. Soc. 109, 5858 (1987)
- (61) Reed R.G., Rutnam F.W., Peters Th., Biochem.J. 191, 867 (1980)
- (62) Renner E., Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen, Volkswirtschaftlicher Verlag Kempten, S.82 (1974)
- (63) Oelschlägel F.J., Schroeder J.R., Stahmann M.A., Anal. Biochem. 34, 331 (1970)
- (64) Hunt S., in: Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, Barrett G.C. Hrsg, Chapman and Hall London New York, S.379 (1985)
- (65) Mopper K., Johnson L., J.Chrom. 256, 27 (1983)
- (66) Alpenfels W.F., Anal.Biochem. 114, 153 (1981)
- (67) Kakac B. Vejdělek Z.J., Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen, Verlag Chemie Weinheim, S.239 (1974)
- (68) Täufel K., Zimmermann R., Fette,Seifen,Anstrichm. 63, 226 (1961)
- (69) Frank H. in: Bock R., Fresenius W., Günzler H., Huber W., Tölg G. Hrsg., Analytiker-Taschenbuch Band4, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, S.337 (1984)
- (70) Hassner A., Vazkan A., Tetrah.Lett. 46, 4475 (1978)
- (71) Jones R.A., in: Comprehensive Heterocyclic Chemistry, Katritzky A.R., Kees C.W., Pergamon Press Oxford, S.255 (1985)
- (72) Müller E., Bayer U. Begr., Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl) Band IV/1c Reduktionen Teil 1, S.289 (1980)
- (73) Olsson K., Pernemalm P.-A., Popoff Th., Theander O., Acta Chem.Scand. B 31, 469 (1977)
- (74) Öste R.E., Dahlqvist A., Sjöström H., Norén O., Miller R., J.Agric.Food Chem. 34, 355 (1986)
- (75) Öste R.E., Miller R., Sjöström H., Norén O., J.Agric.Food Chem. 35, 938 (1987)
- (76) Sheehan J.C., Yang D.-D.H., J.Am.Chem.Soc. 80, 1154 (1958)
- (77) Lehrfeld J., Anal.Chem. 56, 1803 (1984)

LebenslaufManfred Sengl

geboren am 20. Mai 1961 in München als
Sohn von Rosa Sengl, geb. Deuter, Sekretärin,
und Anton Sengl, Versicherungskaufmann

Schulen

1967-1971 Grundschule in Puchheim
1971-1980 Viscardi-Gymnasium in Fürstentfeldbruck
Juli 1980 Abitur

Berufsausbildung

Sommersemester 1981 - Wintersemester 1985
Studium der Lebensmittelchemie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
April 1983 Vorprüfung
Dezember 1985 Hauptprüfung Teil A

Seit Januar 1986 arbeite ich unter Anleitung von Herrn
Professor Dr. Th. Severin am Institut für Pharmazie und
Lebensmittelchemie der Universität München an der vor-
liegenden Dissertation.

